

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

This Page Blank (uspto)

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12P 21/08, C07K 16/40, G01N 33/577	A1	(11) 国際公開番号 WO98/29560
		(43) 国際公開日 1998年7月9日(09.07.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/04884	(74) 代理人 弁理士 水野昭寛(MIZUNO, Akinobu) 〒150 東京都渋谷区渋谷1丁目10番7号 グロリア宮益坂Ⅲ305 Tokyo, (JP)	
(22) 国際出願日 1997年12月26日(26.12.97)	(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BF, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) 優先権データ 特願平8/356444 1996年12月26日(26.12.96) JP	添付公開書類 国際調査報告書	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 富士薬品工業株式会社 (FUJI YAKUHIN KOGYO KABUSHIKI KAISHA)(JP/JP) 〒933 富山県高岡市長慶寺530番地 Toyama, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 為井弘範(TAMEI, Hironori)(JP/JP) 東野 勲(AZUMANO, Isao)(JP/JP) 吉田真一(YOSHIDA, Shin-ichi)(JP/JP) 岩田和士(IWATA, Kazushi)(JP/JP) 〒933 富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工業株式会社内 Toyama, (JP) カルロス ロペス・オーティン(CARLOS, Lopez-Otin)(ES/ES) シーノ パブロ ラロックス 10-6° イズダ サリナス 33400ア ストリアス Asturias, (ES)		
(54)Title: MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST COLLAGENASE 3 AND IMMUNOASSAY METHOD WITH THE USE OF THE SAME		
(54)発明の名称 コラゲナーゼ3に対するモノクローナル抗体及びそれを用いた免疫学的測定法		
(57) Abstract A method whereby latent MMP-13 and active MMP-13 can be separately assayed with the use of an anti-MMP-13 monoclonal antibody. The anti-MMP-13 monoclonal antibody is prepared by using purified human pro-MMP-13. This antibody can be obtained in at least three types including one specifically binding to both of latent MMP-13 and active MMP-13, one binding specifically to latent MMP-13, and one binding specifically to active MMP-13. Combined use of the monoclonal antibodies of these three types together with solid-phase antibodies, enzyme-labelled antibodies (for example EIA), etc., makes it possible to separately assay latent MMP-13 and active MMP-13.		

(57) 要約

抗MP-13モノクローナル抗体を用いての、潜在型や活性型のMP-13を分別して定量することもできる方法を提供する。精製されたヒトプロMP-13を用いて、抗MP-13モノクローナル抗体が作製される。該抗MP-13モノクローナル抗体は潜在型及び活性型MP-13の双方に特異的に結合するものと、潜在型MP-13に特異的に結合するもの及び活性型MP-13に特異的に結合するものとの少なくとも三種類が得られる。これら三種類のモノクローナル抗体を組み合わせ使用し、さらに固相化抗体と酵素標識抗体を用いるなど (EIA など) により、潜在型や活性型のMP-13を分別して定量することを可能にする。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FR	フランス	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SD	スーダン
AN	アンゴラ	GR	ギリシャ	MC	モナコ	TD	チャド
AR	アルゼンチン	HU	ハンガリー	MD	モルドバ	TM	タジキスタン
AT	オーストリア	IE	アイルランド	ME	モンテネグロ	TT	トリニダード・トバゴ
AU	オーストラリア	IL	イスラエル	ML	マリ	UA	ウクライナ
AX	オースランド	IN	インド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	IS	アイスランド	MW	マラウイ	US	米国
BB	バルバドス	IT	イタリア	MX	メキシコ	UY	ウルグアイ
BD	バングラデシュ	JP	日本	NE	ニジェール	VN	ベトナム
BE	ベルギー	KE	ケニア	NI	ニカラガ	WV	ウィニペグ
BF	ブルキナ・ファソ	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
BG	ブルガリア	KG	キルギス	OL	オランダ		
BH	バーレーン	LA	ラオス	OR	オーストラリア		
BI	ブルンジ	LC	セント・ルシア	PR	プエルトリコ		
BJ	ベナン	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア		
BK	バングラ	LU	ルクセンブルグ	RS	セルビア		
BM	バハマ	LV	ラトヴィア	SC	スコットランド		
BN	ブルネイ	LY	リビア	SG	シンガポール		
BO	ボリビア	MA	モロッコ	SI	スロベニア		
BR	ブラジル	MC	モナコ	SK	スロバキア		
BS	バハマ	MD	モルドバ	SL	シエラレオネ		
BT	ブータン	ME	モンテネグロ				
BV	バルト	ML	マリ				
BW	ボツワナ	MR	モーリタニア				
BY	ベラルーシ	MW	マラウイ				
BZ	ベリーズ	MX	メキシコ				
CA	カナダ	NE	ニジェール				
CC	ココス (キリング) 島	NL	オランダ				
CD	コンゴ民主共和国	NO	ノルウェー				
CE	セネガル	NZ	ニュージーランド				
CF	中央アフリカ共和国	OL	オランダ				
CG	コンゴ共和国	OR	オーストラリア				
CH	スイス	PR	プエルトリコ				
CI	コートジボワール	RO	ルーマニア				
CK	クック	RS	セルビア				
CL	チリ	SC	スコットランド				
CM	カメルーン	SG	シンガポール				
CN	中国	SI	スロベニア				
CO	コロンビア	SK	スロバキア				
CR	コスタリカ	SL	シエラレオネ				
CU	キューバ						
CV	カボベルデ						
CY	キプロス						
CZ	チェコ						
DE	ドイツ						
DK	デンマーク						
DM	ドミニカ						
DO	ドミニカ共和国						
DZ	アルジェリア						
EC	エクアドル						
EE	エストニア						
EG	エジプト						
EH	西サハラ						
ES	スペイン						
ET	エチオピア						
FI	フィンランド						
FJ	フィジー						
FK	フォークランド						
FM	ミクロネシア						
FO	フェロエ						
FR	フランス						
GA	ガボン						
GB	イギリス						
GD	グアドループ						
GE	ジョージア						
GF	フランス領ギアナ						
GG	グンズ						
GH	ガーナ						
GI	ジブラルタル						
GL	グリーンランド						
GM	ギニア						
GN	ギニアビサウ						
GP	フランス領ポリネシア						
GQ	ギニアビサウ						
GR	ギリシャ						
GS	サウスジョージア						
GT	グアテマラ						
GU	グアム						
GW	ギニアビサウ						
GX	フランス領ギアナ						
GY	ガイアナ						
HA	ハチマク						
HB	ハバ						
HC	ハチマク						
HD	ハチマク						
HE	ハチマク						
HF	ハチマク						
HG	ハチマク						
HH	ハチマク						
HI	ハチマク						
HJ	ハチマク						
HK	香港						
HL	ハチマク						
HM	ハチマク						
HN	ホンジュラス						
HO	ハチマク						
HP	ハチマク						
HQ	ハチマク						
HR	クロアチア						
HS	ハチマク						
HT	ハイチ						
HU	ハンガリー						
HV	ハチマク						
HW	ハチマク						
HX	ハチマク						
HY	ハチマク						
HZ	ハチマク						

明 細 書

コラゲナーゼ 3 に対するモノクローナル抗体
及びそれを用いた免疫学的測定法

技術分野

本発明は、コラゲナーゼ 3（メタロプロテアーゼ 13、MMP-13）に対するモノクローナル抗体及びそのモノクローナル抗体を用いた免疫学的定量法に関する。さらに詳しく言えば、本発明はMMP-13に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を用いて、潜在型MMP-13及び活性型MMP-13を免疫学的に定量する方法に関する。

本発明は、医学生理学的分野に用いられる、コラゲナーゼ 3（潜在型及び活性型MMP-13）の免疫学的定量法及びそれに用いる試薬に関する。さらに詳しく言えば、本発明は精製MMP-13を用いて作製された、抗MMP-13モノクローナル抗体を用いて、潜在型及び活性型MMP-13を免疫学的に定量する方法及びそのための試薬に関する。

背景技術

細胞外マトリックスは、IV型コラーゲン等のコラーゲン、プロテオグリカン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン、ヘパラン硫酸等の接着性糖タンパク質をはじめとする複雑な成分から構成されている（Martinez-Hernandez et al., Lab. Invest., 48, 656-677, 1983）が、この細胞外マトリックスの分解には、基質特異性を異にするマトリックスメタロプロテアーゼ（以下 MMP と略記する）と総称される一群の酵素、すなわちマトリックスメタロプロテアーゼ類（以下 MMPs と略記する）が関与している。

これまでMMP としては、間質型コラゲナーゼ（MMP-1）、72kDa ゼラチナーゼ（IV型コラゲナーゼあるいはゼラチナーゼAともいう：MMP-2）、ストロムライシン 1（MMP-3）、マトリライシン（MMP-7）、好中球コラゲナーゼ（MMP-8）、92kDa ゼラチナーゼ（IV型コラゲナーゼあるいはゼラチナーゼBともいう：MMP-9）、

ストロムライシン-2 (MMP-10)、ストロムライシン-3 (MMP-11)、マクロファージメタロエラスターゼ (MMP-12)、コラゲナーゼ3 (MMP-13)、膜型MMP (MT-MMP) 等が報告されている (H. Birkedal-Hansen et al., Crit. Rev. Oral Biol. Med., 1, 197-250, 1993; S. D. Shapiro et al., J. Biol. Chem., 268, 23824-23829, 1993; J. M. P. Freije et al., J. Biol. Chem., 269, 16766-16773, 1994; H. Sato et al., Nature, 370, 61-65, 1994)。MMPsは、細胞内で合成、産生され、必要に応じて細胞外へ前駆体 (プロ体もしくは潜在型) として放出される。

これらのMMPsはファミリーを形成し、遺伝子の一次構造は既に報告されている。これらのMMPsのcDNAデータから推定されるアミノ酸配列には相同性が認められており、基本的に分産生時に除かれるN末端のシグナルペプチドに続き、プロペプチドドメイン、Zn²⁺結合触媒ドメイン、5～50アミノ酸よりなるブロリンに富んだヒンジドメイン、C末端のヘモベキシン凝血酵素様ドメインから構成されている。潜在型MMPsはアミノ末端よりプロペプチド、活性中心領域 (中央領域) 及びカルボキシル末端領域などから構成されており、その潜在型MMPs自身はマトリックス成分の分解には関与せず、体内ではプラスミン、フーリンやMMP-3 などにより限定分解を受けて活性化され、あるいは実験的にはチオール基反応性有機水銀化合物などによりアミノ末端プロペプチドが切断され活性型MMPsとなり、各々の基質に対応するマトリックス成分を分解することが知られている (H. Birkedal-Hansen et al., Oral Biol. Med., 1, 197-250, 1993)。

原発巣組織内に存在する癌細胞が浸潤、転移するためには、その周囲に存在する細胞外マトリックスが、癌細胞の移動 (転移) の障害になる。したがって、癌細胞が組織を浸潤し転移するためには、原発巣からの遊離、周辺の細胞外マトリックスの破壊が必要となる。癌細胞の転移は、その後基底膜の破壊、血管への侵入、侵出、二次臓器への生着、増殖等の段階を経て成立する。癌細胞の転移の障壁となっている。例えば、これらのMMPのうち、基底膜の主要構造体であるIV型コラーゲンを主たる基質とするIV型コラゲナーゼ (MMP-2 とMMP-9) は、高転移性の癌細胞における高い発現が数多く報告され、癌細胞の基底膜浸潤への関与が提

唱されてきた(L. A. Liotta et al., *Cell.*, 64: 327-336, 1991)。

MMP の活性発現調節は、少なくとも転写レベル、酵素活性を示さない潜在型酵素から活性型酵素への活性化の段階、MMP の特異的阻害剤であるティッシュ インヒビター オブ メタロプロテアーゼ (TIMP) による活性調節などといった段階で行われていると考えられている (L. M. Matrisian et al., *Trends Genet.*, 6: 121-125, 1990)。全てのMMP は不活性な潜在型として分泌されるが、In vitro の実験では、例えば、MMP-1、MMP-9 の活性化は、プラスミン、トリプシン、カテプシンG等のセリンプロテアーゼによって生じることが示されており、さらに、MMP-9の活性化が活性型MMP-3の作用によっても引き起こされることが報告されている(Y. Ogata et al., *J. Biol. Chem.*, 267: 3581-3584, 1992)。一方、例えば、MMP-2は上述のプロテアーゼの切断部位を持たないため、そのMMP-2の活性化は、これらによつては起こらないと考えられている (D. E. Kleiner, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5: 891-897, 1993)。また組織や体液中においてMMPs活性を特異的に阻害するMMPsのインヒビターであるティッシュ インヒビター オブ メタロプロテアーゼ類 (TIMPs)が存在することが知られている(T. Hayakawa, *Cell Struct. Funct.*, 19, 109-114, 1994)。TIMPs は現在3種類報告されており、各々TIMP-1、TIMP-2及びTIMP-3と呼ばれている。これらTIMPs は、通常活性型MMPsに結合し、組織の修復、組織破壊の阻止、癌転移抑制あるいは細胞増殖促進などの生理的作用を持っていると考えられている。例えば、TIMP-1は潜在型MMP-9に、TIMP-2は潜在型MMP-2に結合し、各々のMMPsの活性化及び自己分解活性を制御していると考えられている。

次に、これらのMMP は、必ずしも癌細胞だけから産生されている訳ではなく、周辺の線維芽細胞や炎症細胞からもそれぞれ異なるMMP が産生されていることも報告されている (K. Tryggvason et al., *Breast Cancer Res. Treat.*, 24: 209-218, 1993; D. E. Kleiner, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5: 891-897, 1993)。例えば、中でもMMP-2は、組織構築の改変を伴うような様々な部位の線維芽細胞で発現しているが、正常組織と癌組織のMMP-2を比較するとその活性化が癌組織で特異的に生じていることが肺癌の例等で報告されている(P. O. Brown et al., C

lin. Exp. Metastasis, 11: 183-189, 1993)。一方、MMP-9では、活性型が検出される頻度は低い。また、癌細胞の浸潤の先端 (invadopodia) で活性型MMP-2が局在することが *in vitro* の実験系で示され、癌細胞浸潤における重要性が示唆されている (W. L. Monsky, et al., Cancer Res., 53: 3159-3164, 1993, Breast Cancer Res. Treat., 53: 3159-3164, 1994)。

こうした事情の下、そのMMP 中の一つであるMMP-13は、乳癌細胞からクローニングされている (Freije et al., J. Biol. Chem., 269, 16766-16773, 1994)。MMP-13は、分子量約60kDa (キログダルトン) の潜在型として発現し、それが活性化され48kDaの活性型MMP-13となる。ところで、潜在型MMP-13は、MT1-MMP やMMP-2によって活性化されることが知られている (Knauper et al., J. Biol. Chem., 271, 17124-17131, 1996)。またMMP-13に関して、mRNAの発現の研究によれば、健常者の各種臓器 (心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓など) での発現は認められず、軟骨細胞及び乳癌細胞で見いだされているのみである (Mitchell et al., J. Clin. Invest., 97, 761-768, 1996)。軟骨細胞での発現はIL-1 β 、TNF- α により上昇することから、これらのサイトカインはMMP-13を介して軟骨の代謝を調整しているのではと考えられる (Reboul et al., J. Clin. Invest., 97, 2011-2019, 1996)。そして、MMP-13は癌転移やリウマチなどの関節炎で重要な役割をしていると考えられ、MMP-13を測定することは、これらを含む各種疾患でのMMP-13の関与を明らかにする上で重要である。また、MMP-13の発現、活性化、酵素活性阻害などを抑制することによるリウマチの治療に関する技術も知られている (Wernicke, DE19501032, 18 July 1996)。

MMP-13を認識する抗体としては、これまでに大腸菌で生産したリコンビナントMMP-13に対するポリクローナル抗体がウサギで作製されたことが報告されており、そこではそのポリクローナル抗体を乳癌の組織染色に使用している (Freije et al., J. Biol. Chem., 269, 16766-16773, 1994)。一方、MMP-13を認識するモノクローナル抗体としては、35アミノ酸 (257-291) よりなる合成ペプチドを抗原として得られた抗体が報告されており (No. F17-18-3-C5; Pfizer Central Research, IgG isotype)、そのモノクローナル抗体は他のMMP (collagenase-1, strom-

lysin-1, 72k and 92kDa gelatinases) と交差反応しないものであるが、潜在型 MMP-13、活性型 MMP-13 両方と反応するもので、イムノブロットに使用することがそこでは開示されている。しかしながら、MMP-13 を精製されたものとして大量に得ることは困難であり、これまで抗原として潜在型 MMP-13 あるいは活性型 MMP-13 を用いて、MMP-13 を認識するモノクローナル抗体を得たという報告はない。

こうした MMP-13 の定量は、合成基質やコラーゲンを基質としたコラゲナーゼ活性を測定する方法による以外報告されていない (Freije et al., J. Biol. Chem., 269, 16766-16773, 1994)。しかし、コラゲナーゼ活性を測定する方法は、MMP-13 に特異的ではなく、他のコラゲナーゼと区別してそれを測定することはできない。また、体液中、例えば血中、関節液中などには MMPs のインヒビターである ティッシュ・インヒビター・オブ・メタロプロテアーゼ類 (TIMPs) が存在しており、そのため MMPs の活性測定から MMPs の定量をすることは困難である。つまり、コラゲナーゼ活性を測定することにより、MMP-13 を定量をすることは難しい。また、MMPs の各々の基質特異性が幅広いことも MMPs の分別定量を困難にしている。

また、直接的ではないが mRNA の発現をノーザンブロット法により半定量することが報告されている (Wernicke et al., J. Rheum., 23, 590-595, 1996) が、この方法は MMP-13 に特異的ではあるが、あくまでも遺伝子の発現レベルであり、MMP-13 の分子形態の分別測定 (例えば、潜在型 MMP-13 と活性型 MMP-13 の分別測定) は不可能である。また、本ノーザンブロットによる方法は mRNA の抽出からはじまりその操作・処理等が非常に煩雑であり、また定量性に欠けるという問題がある。

また遊離の活性型 MMPs の測定は、組織や体液中に存在する MMPs のうちのマトリックス成分の分解に直接関与する活性型 MMPs 量を知る手段となり得るもので、遊離の活性型を定量することにより、MMPs 活性が亢進する疾患、例えば関節症、癌の浸潤、転移、歯周病及び肺線維症のような病態の診断あるいはモニターを行うことが可能となると期待されている。こうしたことから、特に遊離の活性型 MMP-13 を測定することは、組織や体液中に存在する MMP-13 のマトリックス成分の分解に直接関与する活性型 MMP-13 量を知る手段となり得るし、遊離の活性型 MMP-13 を

定量することにより、MMP-13活性が亢進する疾患、病態などの診断あるいはモニターを行うことが可能となると期待される。MMP-13は生体内で潜在型、活性型、TIMPsとの複合体などの形態で存在し、それら互いのバランスが各種疾患、病状などと密接な関連を持つとも予測されるにもかかわらず、上記方法によってはそうした各種形態のMMP-13をそれぞれ区別して測定することはできない。

発明の開示

本発明の目的は、簡単な操作及び試薬を用い、感度並びに精度良く、また迅速にそれぞれのMMP-13量を分別して定量し得る方法を提供することにある。こうした方法に用いる試薬キットを提供することも本発明の目的の一つである。特に本発明の目的は、MMP-13に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を用いて被検試料中の潜在型MMP-13、活性型MMP-13あるいは潜在型及び活性型MMP-13の両方、そして活性型MMP-13とTIMPsとの複合体を測定すること、それによるMMP-13をそれぞれ感度良く並びに精度良く、また迅速に定量し得る方法を提供することにある。

本発明は、MMP-13に対し特異的に反応するところの少なくとも二種類のモノクローナル抗体を測定試薬として用いて、免疫学的に潜在型MMP-13又は活性型MMP-13の測定を行ったり、潜在型、活性型MMP-13両方の測定を行うことを特徴とするMMP-13の定量法を提供するものである。該二種類のモノクローナル抗体としては、それぞれMMP-13の実質的に異なる領域に対し特異的に反応するモノクローナル抗体であることが特に好ましい。本発明の測定法では、サンドイッチ法における固相担体に結合させる抗体として一方のMMP-13に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を用い、そして標識物を付与する抗体として他方のMMP-13に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を用いて、その免疫学的測定を行うことが好ましい。さらにMMP-13に対し特異的に反応するモノクローナル抗体とTIMPsに対し特異的に反応するモノクローナル抗体を測定試薬として用いて複合体からの活性型MMP-13の測定を行うことを特徴とするMMP-13の定量法を提供するものである。

本発明の方法は、固相担体に結合させる抗体あるいは標識物を付与する抗体として、それぞれ、MMP-13の実質的に異なる抗原決定基に対し特異的に反応するモ

ノクローナル抗体を使用することをも特徴とするものである。MMP-13に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を用いて、被検試料中の潜在型MMP-13の測定や活性型MMP-13の測定あるいは潜在型、活性型MMP-13両方をそれぞれ感度並びに精度よく定量しうる方法を提供する。

本発明は、

〔1〕 MMP-13活性を有するタンパク質又はその塩及びMMP-13活性を有するタンパク質の部分ペプチド又はその塩からなる群から選ばれたものに特異的に反応するものであることを特徴とするモノクローナル抗体；

〔2〕 MMP-13又はその塩と実質的に同等な活性を有するか、あるいは実質的に同等の一次構造コンフォメーションを持つものである、タンパク質に対する抗体であることを特徴とする上記〔1〕記載のモノクローナル抗体；

〔3〕 MMP-13又はその塩と実質的に同等な活性を有するか、あるいは実質的に同等の一次構造コンフォメーションを持つものである、タンパク質の部分ペプチド又はその塩に対する抗体であることを特徴とする上記〔1〕又は〔2〕記載のモノクローナル抗体；

〔4〕 活性型MMP-13及び潜在型MMP-13の双方に特異的に反応するものであることを特徴とする上記〔1〕～〔3〕のいずれか一記載のモノクローナル抗体；

〔5〕 潜在型MMP-13のみに特異的に反応するものであることを特徴とする上記〔1〕～〔3〕のいずれか一記載のモノクローナル抗体；

〔6〕 MMP-13活性を有するタンパク質又はその塩及びMMP-13活性を有するタンパク質の部分ペプチド又はその塩からなる群から選ばれたものに特異的に反応するモノクローナル抗体を試薬として用い、潜在型MMP-13、活性型MMP-13及びティッシュ・インヒビター・オブ・メタロプロテアーゼ結合MMP-13の少なくともいずれか一つをその他のものと区別して検出・測定することを特徴とするMMP-13の検出・測定方法；

〔7〕 MMP-13に対し特異的に反応するモノクローナル抗体のうちMMP-13の実質的に異なる領域に対し特異的に反応するモノクローナル抗体であって且つそ

れらモノクローナル抗体のうちの少なくとも二種類を測定試薬として用いて免疫学的に測定を行うことを特徴とするMMP-13の免疫学的定量法：

〔8〕 (1) 使用する二種類のモノクローナル抗体のうち、一方にMMP-13の潜在型に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を用いるか、あるいは(2) 使用する二種類のモノクローナル抗体のうち、一方にMMP-13の活性型に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を用いることを特徴とする上記〔7〕記載の定量法：

〔9〕 MMP-13に対し特異的に反応するモノクローナル抗体が、(1) MMP-13の活性型並びに潜在型の双方に対し特異的に反応するモノクローナル抗体であるか、(2) MMP-13の潜在型のみに特異的に反応するモノクローナル抗体であるか、あるいは(3) MMP-13の活性型のみに特異的に反応するモノクローナル抗体であることを特徴とする上記〔7〕記載の定量法：

〔10〕 使用する二種類のモノクローナル抗体のうち、一方にMMP-13の活性型並びに潜在型の双方に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を用いることを特徴とする上記〔7〕記載の定量法：

〔11〕 使用する二種類の抗体が、各々MMP-13の活性型並びに潜在型の双方に対し特異的に反応するモノクローナル抗体であり、潜在型及び活性型MMP-13を測定することを特徴とする上記〔7〕記載の定量法：

〔12〕 使用する二種類の抗体の一方が、MMP-13の活性型並びに潜在型の双方に対し特異的に反応するモノクローナル抗体で、他方が、MMP-13の潜在型に特異的に反応するモノクローナル抗体であり、潜在型MMP-13を測定することを特徴とする上記〔7〕記載の定量法：

〔13〕 使用する二種類の抗体の一方が、MMP-13の活性型並びに潜在型の双方に対し特異的に反応する抗体で、他方はMMP-13の活性型に特異的に反応するモノクローナル抗体であり、活性型MMP-13を測定することを特徴とする上記〔7〕記載の定量法。

〔14〕 潜在型MMP-13を活性型MMP-13に転化するものがある活性化剤存在下に測定を行うことを特徴とする上記〔7〕記載の定量法：

〔15〕 潜在型MMP-13が活性型MMP-13に転化することを阻害する阻害剤存

在下に測定を行うことを特徴とする上記〔7〕記載の定量法：

〔16〕 MMP-13の活性型とMMP-13の潜在型をそれぞれ定量することを特徴とする上記〔7〕記載の定量法：

〔17〕 使用する二種類のモノクローナル抗体のうち一方を固相担体に結合させる抗体として用い、他方を標識物を付与する抗体として用いて、サンドイッチ法により免疫学的に測定を行うことを特徴とする上記〔7〕～〔16〕のいずれか一記載の定量法：

〔18〕 血液、血清、血漿、関節液等の体液、生体組織、培養組織、培養液などからなる群から選ばれたものを検体として用いることを特徴とする上記〔7〕～〔16〕のいずれか一記載の定量法：

〔19〕 活性型MMP-13にのみ特異的に反応するものであることを特徴とする上記〔1〕～〔3〕のいずれか一記載のモノクローナル抗体：

〔20〕 MMP-13に反応するモノクローナル抗体のうち、ティッシュ・インヒビター・オブ・メタロプロテアーゼ結合MMP-13と反応しないものであることを特徴とする上記〔1〕～〔3〕のいずれか一記載のモノクローナル抗体：

〔21〕 MMP-13に反応するモノクローナル抗体のうち、ティッシュ・インヒビター・オブ・メタロプロテアーゼ結合MMP-13のみに反応するものであることを特徴とする上記〔1〕～〔3〕のいずれか一記載のモノクローナル抗体：

〔22〕 MMP-13活性を有するタンパク質、それと実質的に同等な活性を有するタンパク質又はその塩及びその部分ペプチド又はその塩からなる群から選ばれたものを抗原として用い、それに対する抗体を得ることを特徴とする上記〔1〕～〔3〕及び〔19〕～〔21〕のいずれか一記載の抗体の製造方法：

〔23〕 MMP-13活性を有するタンパク質又はその塩及びMMP-13活性を有するタンパク質の部分ペプチド又はその塩からなる群から選ばれたもので免疫した動物から得られた、MMP-13活性を有するタンパク質又はその塩及びMMP-13活性を有するタンパク質の部分ペプチド又はその塩からなる群から選ばれたものに特異的に反応する抗体を産生する細胞を、継代培養可能な細胞と融合せしめ、継代培養可能でかつMMP-13を包含するタンパク質に対する抗体を産生するハイブリッド細胞を選別することを特徴とする上記〔1〕～〔3〕及び〔19〕～〔21〕の

いずれか一記載の抗体の産生方法；及び

〔24〕 MMP-13に特異的に反応するモノクローナル抗体とティッシュ・インヒビター・オブ・マトロプロテアーゼ類に特異的に反応する抗体を用い、活性型MMP-13とTIMPs 複合体を免疫学的に測定することを特徴とする活性型MMP-13の定量法を提供する。

本発明に従えば、さらに次のような態様、すなわち

〔25〕 組換えヒトプロMMP-13を免疫原として用いて作製され、MMP-13活性を有するタンパク質又はその塩及びMMP-13活性を有するタンパク質の部分ペプチド又はその塩からなる群から選ばれたものに特異的に反応するものであることを特徴とするモノクローナル抗体；

〔26〕 クローン番号181-1B7、181-2D10、181-3C4、181-4E11、181-5A9、181-7F4、181-8B1、181-10B8、181-11A3、181-14G11 及び181-15A12 からなる群から選ばれたハイブリドーマにより産生されたものであることを特徴とするモノクローナル抗体；

〔27〕 クローン番号181-3C4 のハイブリドーマにより産生されたモノクローナル抗体と、クローン番号181-1B7、181-2D10、181-4E11、181-5A9、181-7F1、181-8B1、181-10B8、181-11A3、181-14G11 及び181-15A12 からなる群から選ばれたハイブリドーマにより産生されたモノクローナル抗体とを、組合わせて使用することを特徴とする上記〔7〕記載の定量法；

〔28〕 使用する二種類の抗体が、MMP-13の活性型並びに潜存型の双方に対し特異的に反応する酵素標識モノクローナル抗体と、MMP-13の潜存型に特異的に反応する固相化モノクローナル抗体とであることを特徴とする上記〔7〕記載の定量法；

〔29〕 クローン番号181-3C4 のハイブリドーマにより産生され且つ固相化されたモノクローナル抗体と、クローン番号181-1B7、181-2D10、181-4E11、181-5A9、181-7F1、181-8B1、181-10B8、181-11A3、181-14G11 及び181-15A12 からなる群から選ばれたハイブリドーマにより産生され且つ酵素標識されたモノクローナル抗体とを、組合わせて使用することを特徴とする上記〔7〕記載の

定量法:

〔3.0〕 クローン番号181-3C1 のハイブリドーマにより産生され且つ固相化されたモノクローナル抗体と、クローン番号181-15A12 のハイブリドーマにより産生され且つ酵素標識されたモノクローナル抗体とを、組合わせて使用することを特徴とする上記〔7〕記載の定量法;

〔3.1〕 クローン番号181-1B7、181-2D10、181-3C1、181-4E11、181-5A9、181-7F1、181-8B1、181-10B8、181-11A3、181-14G11 及び181-15A12 からなる群から選ばれたハイブリドーマにより産生されたモノクローナル抗体のうちより少なくとも二つを選んで、それらを組合わせて使用することを特徴とする上記〔7〕記載の定量法;

〔3.2〕 使用する二種類の抗体が、MMP-13の活性型に特異的に反応する酵素標識モノクローナル抗体と、MMP-13の活性型に特異的に反応する固相化モノクローナル抗体とであることを特徴とする上記〔7〕記載の定量法;

〔3.3〕 クローン番号181-1B7、181-2D10、181-3C1、181-4E11、181-5A9、181-7F1、181-8B1、181-10B8、181-11A3、181-14G11 及び181-15A12 からなる群から選ばれたハイブリドーマにより産生され且つ酵素標識されたモノクローナル抗体と、クローン番号181-1B7、181-2D10、181-3C1、181-4E11、181-5A9、181-7F1、181-8B1、181-10B8、181-11A3、181-14G11 及び181-15A12 からなる群から選ばれ且つ該酵素標識されたモノクローナル抗体とは異なるハイブリドーマにより産生され且つ固相化されたモノクローナル抗体とを、組合わせて使用することを特徴とする上記〔7〕記載の定量法;

〔3.4〕 クローン番号181-7F4 のハイブリドーマにより産生されたモノクローナル抗体と、クローン番号181-1B7、181-2D10、181-3C1、181-4E11、181-5A9、181-8B1、181-10B8、181-11A3、181-14G11 及び181-15A12 からなる群から選ばれたハイブリドーマにより産生されたモノクローナル抗体とを、組合わせて使用することを特徴とする上記〔7〕記載の定量法;

〔3.5〕 クローン番号181-7F4 のハイブリドーマにより産生され且つ固相化されたモノクローナル抗体と、クローン番号181-1B7、181-2D10、181-3C1、181-4E11、181-5A9、181-8B1、181-10B8、181-11A3、181-14G11 及び181-15A12

2 からなる群から選ばれたハイブリドーマにより産生され且つ酵素標識されたモノクローナル抗体とを、組合わせて使用することを特徴とする上記〔7〕記載の定量法；

〔3.6〕 クローン番号181-7F4 のハイブリドーマにより産生され且つ固相化されたモノクローナル抗体と、クローン番号181-15A12 のハイブリドーマにより産生され且つ酵素標識されたモノクローナル抗体とを、組合わせて使用することを特徴とする上記〔7〕記載の定量法；

〔3.7〕 クローン番号181-1B7 のハイブリドーマにより産生されたモノクローナル抗体と、クローン番号181-2D10、181-3C1、181-4E11、181-5A9、181-7F4、181-8B1、181-10B8、181-11A3、181-14G11 及び181-15A12 からなる群から選ばれたハイブリドーマにより産生されたモノクローナル抗体とを、組合わせて使用することを特徴とする上記〔7〕記載の定量法；

〔3.8〕 クローン番号181-1B7 のハイブリドーマにより産生され且つ固相化されたモノクローナル抗体と、クローン番号181-2D10、181-3C1、181-4E11、181-5A9、181-7F4、181-8B1、181-10B8、181-11A3、181-14G11 及び181-15A12 からなる群から選ばれたハイブリドーマにより産生され且つ酵素標識されたモノクローナル抗体とを、組合わせて使用することを特徴とする上記〔7〕記載の定量法；

〔3.9〕 クローン番号181-1B7 のハイブリドーマにより産生され且つ固相化されたモノクローナル抗体と、クローン番号181-15A12 のハイブリドーマにより産生され且つ酵素標識されたモノクローナル抗体とを、組合わせて使用することを特徴とする上記〔7〕記載の定量法が挙げられる。

さらに別の態様では、本発明は

〔4.0〕 対象抗原を含有する被検試料に第1の抗体と第2の抗体を接触させることにより前記対象抗原と前記第1の抗体と前記第2の抗体とからなる複合体を形成させる工程を含む免疫学的測定方法において、前記第1の抗体と前記第2の抗体のいずれか一方が、少なくともMMP-13に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする方法；

〔4.1〕 前記第1の抗体と前記第2の抗体のいずれもが、MMP-13に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする上記〔4.0〕記載の方法；

〔4.2〕 前記第1の抗体と前記第2の抗体のうち、一方が潜在型MMP-13にのみに特異性を有するモノクローナル抗体であり、他方は潜在型MMP-13及び活性型MMP-13の双方に特異性を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする上記〔4.0〕記載の方法；

〔4.3〕 前記第1の抗体と前記第2の抗体のいずれもが、潜在型MMP-13及び活性型MMP-13の双方に特異性を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする上記〔4.0〕記載の方法；

〔4.4〕 前記第1の抗体と前記第2の抗体のうち、一方が活性型MMP-13にのみに特異性を有するモノクローナル抗体であり、他方は潜在型MMP-13及び活性型MMP-13の双方に特異性を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする上記〔4.0〕記載の方法；

〔4.5〕 前記被検試料を、当該被検試料中の対象抗原に対する固相担体に結合されている第1抗体（固相化抗体）及び標識されている第2抗体（標識抗体）とに接触させ、当該第1抗体と当該抗原と当該第2抗体との複合体を形成させ、当該複合体における標識抗体又は未反応標識抗体のいずれかを測定することを特徴とする上記〔4.0〕～〔4.4〕のいずれか一記載の方法；

〔4.6〕 (i) (a) 対象抗原を含有する被検試料に固相担体に結合されている第1抗体を接触させることにより前記対象抗原を前記第1の固相化抗体に反応させ、必要に応じ固相を洗浄処理した後標識された第2抗体を接触させることにより免疫複合体を形成させるか、あるいは (b) 対象抗原を含有する被検試料に標識された第2抗体を接触させることにより前記対象抗原を前記第2の標識抗体に反応させ、次に固相担体に結合されている第1抗体を接触させることにより免疫複合体を形成させ、

(i i) 必要に応じ固相を洗浄処理して、当該複合体における標識抗体又は未反応標識抗体のいずれかを測定することを特徴とする〔4.0〕～〔4.5〕のいずれか一記載の方法；

〔4.7〕 測定対象試料が、全血、血清、血漿、関節液などの体液または乳

癌組織などの生体組織あるいは細胞または細胞の培養液である上記〔40〕～〔46〕のいずれか一記載の方法；

〔48〕 上記〔1〕～〔5〕、〔19〕～〔21〕、〔25〕及び〔26〕のいずれか一記載のMMP-13に対するモノクローナル抗体を標識したものであることを特徴とする免疫学的測定試薬；

〔49〕 標識が、放射性同位体、酵素、発光性物質、蛍光性物質、金属コロイド、色素物質及びビオチンから成る群から選ばれたものであることを特徴とする上記〔48〕記載の免疫学的測定試薬；

〔50〕 標識化されている試薬がサンドイッチ・アッセイ法による抗原測定系に使用するものであることを特徴とする上記〔48〕または〔49〕記載の免疫学的測定試薬。

〔51〕 上記〔1〕～〔5〕、〔19〕～〔21〕、〔25〕及び〔26〕のいずれか一記載のMMP-13に対するモノクローナル抗体を固相化したものであることを特徴とする免疫学的測定試薬；

〔52〕 固相が、ガラス、シリカゲル、シリカ-アルミナ、アルミナ、磁化鉄、磁合金、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリメタクリレート、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体、ポリアクリルアミド、架橋ポリアクリルアミド、スチレン-メタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレイン-エチレングリコールジメタクリレート共重合体、架橋化アルブミン、コラーゲン、ゼラチン、デキストラン、アガロース、架橋アガロース、天然または変成セルロース、架橋デキストラン、ポリアミド、ポリウレタン、ポリエポキシ樹脂、細胞及び赤血球からなる群から選ばれたものであることを特徴とする上記〔51〕記載の免疫学的測定試薬；及び

〔53〕 固相化されている試薬がサンドイッチ・アッセイ法による抗原測定系に使用するものであることを特徴とする上記〔51〕または〔52〕記載の免疫学的測定試薬を提供する。

さらに別の態様では、本発明は

〔54〕 上記〔1〕～〔5〕、〔19〕～〔21〕、〔25〕及び〔26〕のいずれか一記載のMMP-13に対するモノクローナル抗体もしくは該モノクローナル抗体の断片または該標識化物を含有することを特徴とするMMP-13の測定用試薬；

〔55〕 上記〔1〕～〔5〕、〔19〕～〔21〕、〔25〕及び〔26〕のいずれか一記載のMMP-13に対するモノクローナル抗体もしくは該モノクローナル抗体の断片または該標識化物を含有することを特徴とする癌検査薬；

〔56〕 該癌が、乳癌であることを特徴とする上記〔55〕記載の癌検査薬；

〔57〕 上記〔1〕～〔5〕、〔19〕～〔21〕、〔25〕及び〔26〕のいずれか一記載のMMP-13に対するモノクローナル抗体もしくは該モノクローナル抗体の断片または該標識化物を含有することを特徴とするMMP-13の免疫染色用試薬；

〔58〕 ヒト腫瘍またはヒト癌を免疫染色するためのものであることを特徴とする上記〔57〕記載の試薬；及び

〔59〕 標識が、放射性同位体、酵素、発光性物質、蛍光性物質、金属コロイド、色素物質及びビオチンから成る群から選ばれたものであることを特徴とする上記〔54〕～〔58〕のいずれか一記載の薬を提供する。

〔60〕 MMP-13活性を有する組換えタンパク質又はその塩及びMMP-13活性を有する組換えタンパク質の部分ペプチド又はその塩からなる群から選ばれたもので免疫した動物から得られ且つMMP-13活性を有するタンパク質又はその塩及びMMP-13活性を有するタンパク質の部分ペプチド又はその塩からなる群から選ばれたものに特異的に反応する抗体を産生することを特徴とする継代培養可能なハイブリドーマ細胞；

〔61〕 上記〔1〕～〔5〕、〔19〕～〔21〕、〔25〕及び〔26〕のいずれか一記載のモノクローナル抗体を産生することを特徴とする上記〔60〕記載のハイブリドーマ細胞；

〔62〕 MMP-13活性を有する組換えタンパク質又はその塩及びMMP-13活性を有する組換えタンパク質の部分ペプチド又はその塩からなる群から選ばれたも

ので免疫した動物から得られた抗体を産生する細胞を、継代培養可能な細胞と融合せしめ、継代培養可能でかつMMP-13を包含するタンパク質に対する抗体を産生するハイブリッド細胞を選別することを特徴とする継代培養可能なハイブリッドマ細胞作製方法及び

〔63〕 上記〔60〕または〔61〕記載のハイブリッドマ細胞を得ることを特徴とする上記〔62〕記載のハイブリッドマ細胞作製方法を提供する。

本発明において、そのモノクローナル抗体の反応（あるいは認識、あるいは結合）するMMP-13、潜在型MMP-13、活性型MMP-13は、それぞれ実質的にそれぞれのMMP-13、潜在型MMP-13、活性型MMP-13と同等な生物学的な活性、酵素学的な活性あるいは免疫学的な活性を有するものをいい、通常は生体内に存在している形態のもの、生体から単離することのできる形態のものを含んでいて良く、また同一遺伝子に由来する変異体であってもよい。

図面の簡単な説明

図1は、測定系A（固相用クローン No. 181-3C4、酵素標識用クローン No. 181-15A12）で、組換えヒト潜在型MMP-13を標準品とした場合の標準曲線の一例を示す。

図2は、測定系B（固相用クローン No. 181-7F4、酵素標識用クローン No. 181-15A12）で、組換えヒト潜在型MMP-13を標準品とした場合の標準曲線の一例を示す。

図3は、測定系A（固相用クローン No. 181-3C4、酵素標識用クローン No. 181-15A12）による、各種疾患における関節液や血清中のMMP-13の測定の結果を示す。

図4は、測定系B（固相用クローン No. 181-7F4、酵素標識用クローン No. 181-15A12）による、各種疾患における関節液や血清中のMMP-13の測定の結果を示す。

図5は、組換えヒト潜在型MMP-13のゲル濾過により得られる各フラクションにつき、そのMMP-13量を測定系A（固相用クローン No. 181-3C4、酵素標識用クローン No. 181-15A12）、測定系B（固相用クローン No. 181-7F4、酵素標識用ク

クローン No. 181-15A12) 及び測定系 C (固相用クローン No. 181-1B7, 酵素標識用クローン No. 181-15A12) で測定した結果を示す。

図 6 は、組換えヒト潜在型 MMP-13 を 4 APMA で活性化した生成物 (活性型 MMP-13) のゲル濾過により得られる各フラクションにつき、その MMP-13 を測定系 A (固相用クローン No. 181-3C4, 酵素標識用クローン No. 181-15A12)、測定系 B (固相用クローン No. 181-7F4, 酵素標識用クローン No. 181-15A12) 及び測定系 C (固相用クローン No. 181-1B7, 酵素標識用クローン No. 181-15A12) で測定した結果を示す。

図 7 は、クローン No. 181-15A12 を用いて乳癌組織を組織染色した結果を示すヒト生体組織である生物の形態を示す写真である。

図 8 は、活性型 MMP-13 と、TIMP-1 を 1 対 0 ～ 1 対 10 の比率で混合し MMP-13-TIMP-1 複合体を作製し、測定系 D (固相用クローン No. 7-23C9 (マウス抗 TIMP-1 抗体)、酵素標識用クローン No. 181-15A12) で測定した結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明は MMP-13 に対し特異的に反応するところの少なくとも二種類のモノクローナル抗体を測定試薬として用いて、免疫学的に潜在型 MMP-13 の測定あるいは活性型 MMP-13 の測定や、潜在型、活性型 MMP-13 両方の測定を行うことを特徴とする MMP-13 の定量法を提供する。該二種類のモノクローナル抗体としては、それぞれ MMP-13 の異なる領域に対し特異的に反応するモノクローナル抗体であることが好ましい。本発明の測定法では、サンドイッチ法における固相に結合させる抗体として一方の MMP-13 に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を用い、そして標識物を付与する抗体として他方の MMP-13 に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を用いて、その免疫学的測定を行うことが好ましい。本発明の方法は、固相担体に結合させる抗体あるいは標識物を付与する抗体として、それぞれ MMP-13 の実質的に異なる抗原決定基に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を使用することをも特徴とするものである。

さらに、本発明では、本発明に係わる MMP-13 と特異的に反応するモノクローナル抗体などの抗体が提供される。本発明に係わるモノクローナル抗体などの抗体

により、癌の診断はもとより癌の浸潤、転移に係わる研究に有用な研究手段、さらにはアルツハイマー病の発症機作や診断方法に係わる研究に有用な研究手段が提供される。

本発明に係わるモノクローナル抗体は、本発明により得られるヒトMMP-13を免疫原として公知の方法で動物を免疫したり、当該分野で知られたあるいは汎用されている方法、例えばミルシュタインらの方法 (Nature, 256: 495-97, 1975)により製造することができる。この方法において、免疫原としてはリコンビナントヒトMMP-13を使用することを特徴としているが、免疫原としては天然型MMP-13も使用することができる。

ヒトMMP-13としては、生体内外の産生細胞、例えば、培養細胞、摘出組織、培養組織などから得ることができ、例えば、軟骨細胞、乳癌細胞などの細胞などから得ることができる。さらに、ヒトMMP-13は、リコンビナントヒトMMP-13として得ることができ、例えば、軟骨細胞、乳癌細胞などのヒトMMP-13産生細胞から遺伝子組換えの技術を利用して得ることができる。例えば、リコンビナントヒトMMP-13は、Knauper et al., J. Biol. Chem., 271, 1544-1550, 1996に記載の方法あるいはその方法を参考にして得ることができる。該Knauper et al.の方法により調製したヒトMMP-13あるいはそれから誘導されたものが免疫抗原として好適に使用できる。これらMMP-13は、従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製してから用いることができる。精製されたリコンビナントヒトMMP-13は、モノクローナル抗体作製のための免疫抗原として好適に使用できる。

さらに該モノクローナル抗体は、常用される方法によって適宜標識することができる。標識としては、酵素、放射性同位体（放射性物質）、化学ルミネッセンス化合物などの発光性物質、蛍光性物質、金属コロイド、補欠分子類、色素物質及びビオチン等を使用することができる。以下抗体の作製につき詳しく説明する。

本発明のモノクローナル抗体は、ミエローマ細胞を用いての細胞融合技術を利用して得られたモノクローナル抗体であってよいことはいうまでもない。本発明のモノクローナル抗体は、例えば次のような工程で作製できる。

1. 免疫原性抗原の調製
2. 免疫原性抗原による動物の免疫
3. ミエローマ細胞（骨髓腫細胞）の調製
4. 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合
5. ハイブリドーマ（融合細胞）の選択及びモノクローン化
6. モノクローナル抗体の製造

1. 免疫原性抗原の調製

抗原としては、例えば天然由来のMMP-13、Knauper et al., J. Biol. Chem., 271, 1544-1550, 1996に記載の方法に従い調製したリコンビナントヒトプロMMP-13を用いる。MMP-13は、潜存型MMP-13や活性型MMP-13を用いることができ、さらに免疫原性コンジュゲートなどにしてもよいが、そのまま適当なアジュバントと混合して動物を免疫するのに使用できる。こうした抗原は、各種原料、例えば培養細胞、培養組織など、形質転換体細胞などの抗原産生材料から従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、例えばジエチルアミノエチル基あるいはカルボキシメチル基などを持つ担体などを用いたイオン交換クロマトグラフィー法、例えばブチル基、オクチル基、フェニル基など疎水性基を持つ担体などを用いた疎水性クロマトグラフィー法、色素ゲルクロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティー・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製して得ることができる。好ましくは、ホリアクリルアミド電気泳動、モノクローナル抗体などの抗原と特異的に反応する抗体などを固定化したアフィニティー・クロマトグラフィーなどで処理し精製分離処理できる。

例えば、ゼラチン・アガロース・アフィニティー・クロマトグラフィー、ヘパリン・アガロース・クロマトグラフィーなどが挙げられる。さらにMMP-13は、そ

れを断片化したもの、あるいはクローニングされ、配列決定されたcDNA配列から推定されるアミノ酸配列に基づき特徴的な配列領域を選び、ポリペプチドをデザインして化学合成し、得られた合成ポリペプチド断片であってもよく、その断片を適当な縮合剤を介して種々の担体タンパク質類と結合させてハプテンタンパク質の如き免疫原性コンジュゲートとし、これを用いて特定の配列のみと反応できる（あるいは特定の配列のみを認識できる）モノクローナル抗体をデザインするのに用いることもできる。デザインされるポリペプチドには予めシステイン残基などを付加し、免疫原性コンジュゲートの調製を容易にできるようにしておくことができる。担体タンパク質類と結合させるにあたっては、担体タンパク質類はまず活性化されることことができる。こうした活性化にあたり活性化結合基を導入することが挙げられる。

活性化結合基としては、(1) 活性化エステルあるいは活性化カルボキシル基、例えばニトロフェニルエステル基、ペンタフルオロフェニルエステル基、1-ベンゾトリアゾールエステル基、N-スクシンイミドエステル基など、(2) 活性化ジチオ基、例えば2-ピリジルジチオ基などが挙げられる。担体タンパク質類としては、キーホール・リンペット・ヘモシアニン (KLH)、牛血清アルブミン (BSA)、卵白アルブミン、グロブリン、ポリリジンなどのポリペプチド、細菌菌体成分、例えばBCGなどが挙げられる。

2. 免疫原性抗原による動物の免疫

動物を免疫するには、例えば村松繁、他編、実験生物学講座14、免疫生物学、丸善株式会社、昭和60年、日本生化学会編、統生化学実験講座5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986年、日本生化学会編、新生化学実験講座12、分子免疫学III、抗原・抗体・補体、東京化学同人、1992年などに記載の方法に準じて行うことができる。抗原と共に用いられるアジュバントとしては、例えばフロイント完全アジュバント、リビ(Ribi)アジュバント、百日咳ワクチン、BCG、リビッドA、リボソーム、水酸化アルミニウム、シリカなどが挙げられる。免疫は、例えばBALB/cなどのマウスをはじめとする動物を使用して行われる。抗原の投与量は、例えばマウスに対して約1~400 μ g/動

物で、一般には宿主動物の腹腔内や皮下に注射し、以後1～1週間おきに、好ましくは1～2週間ごとに腹腔内、皮下、静脈内あるいは筋肉内に追加免疫を2～10回程度反復して行う。免疫用のマウスとしてはBALB/c系マウスの他、BALB/c系マウスと他系マウスとのF1マウスなどを用いることもできる。

必要に応じ、抗体価測定系を調製し、抗体価を測定して動物免疫の程度を確認できる。

3. ミエローマ細胞（骨髄腫細胞）の調製

細胞融合に使用される無限増殖可能株（腫瘍細胞株）としては免疫グロブリンを産生しない細胞株から選ぶことができ、例えばP3-NS-1-Ag14-1 (NS-1, Eur. J. Immunol., 6, 511～519, 1976)、SP2/0-Ag14 (SP2, Nature, 276, 269～270, 1978)、マウスミエローマMOPC-21セルライン由来のP3-X63-Ag8-U1 (P3U1, Current topics in Microbiol. and Immunol., 81, 1～7, 1978)、P3-X63-Ag8 (X63, Nature, 256, 495～497, 1975)、P3-X63-Ag8-653 (653, J. Immunol., 123, 1548～1550, 1979)などを用いることができる。8-アザグアニン耐性のマウスミエローマ細胞株はダルベッコMEM培地 (DMEM培地)、RPMI 1640培地などの細胞培地に、例えばペニシリン、アミカシンなどの抗生物質、牛胎児血清 (FCS) などを加え、さらに8-アザグアニン (例えば5～45 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加えた培地で継代されるが、細胞融合の2～5日前に正常培地で継代して所要数の細胞株を用意することができる。また使用細胞株は、凍結保存株を約37℃で完全に解凍したのちRPMI-1640培地などの正常培地で3回以上洗浄後、正常培地で培養して所要数の細胞株を用意したものであってもよい。

1. 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合

上記2. の工程に従い免疫された動物、例えばマウスは最終免疫後、2～5日後にその脾臓が摘出され、それから脾細胞懸濁液を得る。脾細胞の他、生体各所のリンパ節細胞を得て、それを細胞融合に使用することもできる。こうして得ら

れた脾細胞懸濁液と上記3.の工程に従い得られたミエローマ細胞株を、例えば最小必須培地(MEM培地)、DMEM培地、RPMI-1640培地などの細胞培地中に置き、細胞融合剤、例えばポリエチレングリコールを添加する。細胞融合剤としては、この他各種当該分野で知られたものを用いることができ、この様なものとしては不活性化したセンダイウイルス(HVJ: Hemagglutinating virus of Japan)なども挙げられる。好ましくは、例えば30~60%のポリエチレングリコールを0.5~2ml加えることができ、分子量が1,000~8,000のポリエチレングリコールを用いることができ、さらに分子量が1,000~1,000のポリエチレングリコールがより好ましく使用できる。融合培地中でのポリエチレングリコールの濃度は、例えば30~60%となるようにすることが好ましい。必要に応じ、例えばジメチルスルホキシドなどを少量加え、融合を促進することもできる。融合に使用する脾細胞(リンパ球):ミエローマ細胞株の割合は、例えば1:1~20:1とすることが挙げられるが、より好ましくは4:1~7:1とすることができる。

融合反応を1~10分間行い、次にRPMI-1640培地などの細胞培地を加える。融合反応処理は複数回行うこともできる。融合反応処理後、遠心などにより細胞を分離した後選択用培地に移す。

5. ハイブリドーマ(融合細胞)の選択及びモノクローン化

選択用培地としては、例えばヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む、FCS含有MEM培地、RPMI-1640培地などの培地、所謂HAT培地が挙げられる。選択培地交換の方法は、一般的には培養プレートに分注した容量と等容量を翌日加え、その後1~3日ごとにHAT培地で半量ずつ交換するというようにすることができるが、適宜これに変更を加えて行うこともできる。また融合後8~16日目には、アミノプテリンを除いた、所謂HT培地で1~4日ごとに培地交換をすることができる。フィーダーとして、例えばマウス胸腺細胞を使用することもでき、それが好ましい場合がある。

ハイブリドーマの増殖のさかんな培養ウェルの培養上清を、例えば放射免疫分析(RIA)、酵素免疫分析(ELISA)、蛍光免疫分析(FIA)などの測

定系、あるいは蛍光惹起細胞分離装置（FACS）などで、MMP-13あるいはその断片ペプチドを抗原として用いたり、あるいは標識抗マウス抗体を用いて目的抗体を測定するなどして、スクリーニングしたりする。

目的抗体を産生しているハイブリドーマをクローニングする。クローニングは、寒天培地中でコロニーをピック・アップするか、あるいは限界希釈法によりなされうる。限界希釈法でより好ましく行うことができる。クローニングは複数回行うことが好ましい。

6. モノクローナル抗体の製造

得られたハイブリドーマ株は、FCS含有MEM培地、RPMI-1640培地などの適当な増殖用培地中で培養し、その培地上清から所望のモノクローナル抗体を得ることが出来る。大量の抗体を得るためには、ハイブリドーマを腹水化することが挙げられる。この場合ミエローマ細胞由来の動物と同系の組織適合性動物の腹腔内に各ハイブリドーマを移植し、増殖させるか、例えばヌード・マウスなどに各ハイブリドーマを移植し、増殖させ、該動物の腹水中に産生されたモノクローナル抗体を回収して得ることが出来る。動物はハイブリドーマの移植に先立ち、プリスタン（2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン）などの鉱物油を腹腔内投与しておくことができ、その処理後、ハイブリドーマを増殖させ、腹水を採取することもできる。腹水液はそのまま、あるいは従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティー・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製してモノクローナル抗体として用いることができる。好ましくは、モノクローナル抗体を含有する腹水は、硫酸分画した後、DEAE-セファロースの如き、陰イオン交換ゲル及びプロテインAカラムの如きアフィニティーカラムなどで処理し精製分離処理できる。特に好ましくは、抗原又は抗原断片（例えば合成ペプチド、組換え抗原タンパク質あるいはペプチド、抗体が特異的に認識する部位など）を固定化したアフィニティー・クロマトグラフィー、プロテインAを固定化したアフィニティー・クロマトグラフィーなどが挙げられる。

またこうして大量に得られた抗体の配列を決定したり、ハイブリドーマ株から得られた抗体をコードする核酸配列を利用して、遺伝子組換え技術により抗体を作製することも可能である。

さらにこれら抗体をトリプシン、バシリン、ペプシンなどの酵素により処理して、場合により還元して得られるFab、Fab'、F(ab')₂、といった抗体フラグメントにして使用してもよい。

標識物を付与する抗体としては、IgG 両分、更にはペプシン消化後還元して得られる特異的結合部Fab'を用いることができる。これらの場合の標識物の例としては、下記するように酵素（ヘルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼあるいはβ-D-ガラクトシダーゼなど）、化学物質、蛍光物質あるいは放射性同位元素などがある。

本発明での検知・測定は、イムノ染色、例えば組織あるいは細胞染色、イムノアッセイ、例えば競合型イムノアッセイまたは非競合型イムノアッセイで行うことができ、ラジオイムノアッセイ、ELISAなどを用いることができ、B-F分離を行ってもあるいは行わないでその測定を行うことができる。好ましくは放射免疫測定法や酵素免疫測定法であり、さらにサンドイッチ型アッセイが挙げられる。例えばサンドイッチ型アッセイでは、MMP-13に対する抗体の一方を検出可能に標識化する。同じ抗原を認識できる他の抗体を固相に固定化する。

検体と標識化抗体及び固相化抗体を必要に応じ順次反応させるためインキュベーション処理し、ここで非結合抗体を分離後、標識物を測定する。測定された標識の量は抗原、すなわちMMP-13の量と比例する。このアッセイでは、不溶化抗体や、標識化抗体の添加の順序に応じて同時サンドイッチ型アッセイ、フォワード（forward）サンドイッチ型アッセイあるいは逆サンドイッチ型アッセイなどと呼ばれる。例えば洗浄、攪拌、震盪、ろ過あるいは抗原の予備抽出等は、特定の状況のもとでそれら測定工程の中で適宜採用される。特定の試薬、緩衝液等の濃度、温度あるいはインキュベーション処理時間などのその他の測定条件は、検体中の抗原の濃度、検体試料の性質等の要素に従って変えることができる。当業者は通常の実験法を用いながら各測定に対して有効な最適の条件を適宜選定して測定を

行うことが出来る。

抗原あるいは抗体を固相化できる多くの担体が知られており、本発明ではそれらから適宜選んで用いることができる。担体としては、抗原抗体反応などに使用されるものが種々知られており、本発明においても勿論これらの公知のものの中から選んで使用できる。特に好適に使用されるものとしては、例えばガラス、例えば活性化ガラス、多孔質ガラス、シリカゲル、シリカ-アルミナ、アルミナ、酸化鉄、酸化合金などの無機材料、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリメタクリレート、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体、ポリアクリルアミド、架橋ポリアクリルアミド、スチレン-メタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレイン-エチレングリコールジメタクリレート共重合体など、架橋化アルブミン、コラーゲン、ゼラチン、デキストラン、アガロース、架橋アガロース、セルロース、微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、セルロースアセテートなどの天然または変成セルロース、架橋デキストラン、ナイロンなどのポリアミド、ポリウレタン、ポリエポキシ樹脂などの有機高分子物質、さらにそれらを乳化重合して得られたもの、細胞、赤血球などで、必要に応じ、シランカップリング剤などで官能性を導入してあるものが挙げられる。

さらに、ろ紙、ビーズ、試験容器の内壁、例えば試験管、タイタープレート、タイターウェル、ガラスセル、合成樹脂製セルなどの合成材料からなるセル、ガラス棒、合成材料からなる棒、末端を太くしたりあるいは細くしたりした棒、末端に丸い突起をつけたりあるいは扁平な突起をつけた棒、薄板状にした棒などの固体物質（物体）の表面などが挙げられる。

これら担体へは、抗体を結合させることができ、好ましくは本発明で得られるMMP-13に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を結合させることができる。担体とこれら抗原抗体反応に関与するものとの結合は、吸着などの物理的な手法、あるいは縮合剤などを用いたり、活性化されたものなどを用いたりする化学的な方法、さらには相互の化学的な結合反応を利用した手法などにより行うことが出来る。

標識としては、酵素、酵素基質、酵素インヒビター、補欠分子類、補酵素、酵素前駆体、アポ酵素、蛍光物質、色素物質、化学ルミネッセンス化合物、発光物質、発色物質、磁気物質、金属粒子、例えば金コロイドなど、放射性物質などを挙げる事ができる。酵素としては、脱水素酵素、還元酵素、酸化酵素などの酸化還元酵素、例えばアミノ基、カルボキシル基、メチル基、アシル基、リン酸基などを転移するのを触媒する転移酵素、例えばエステル結合、グリコシド結合、エーテル結合、ペプチド結合などを加水分解する加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼなどを挙げる事ができる。酵素は複数の酵素を複合的に用いて検知に利用することもできる。例えば酵素的サイクリングを利用することもできる。

代表的な放射性物質の標識用同位体元素としては、 $[^{32}\text{P}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ などが挙げられる。

代表的な酵素標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼなどのペルオキシダーゼ、大腸菌 β -D-ガラクトシダーゼなどのガラクトシダーゼ、マレーン・デヒドロゲナーゼ、グルコース-6-フォスフェート・デヒドロゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、カタラーゼ、ウシ小腸アルカリホスファターゼ、大腸菌アルカリホスファターゼなどのアルカリホスファターゼなどが挙げられる。

アルカリホスファターゼを用いた場合、4-メチルウンベリフェリルフォスフェートなどのウンベリフェロン誘導体、ニトロフェニルホスフェートなどのリン酸化フェノール誘導体、NADPを利用した酵素的サイクリング系、ルシフェリン誘導体、ジオキセタン誘導体などの基質を使用したりして、生ずる蛍光、発光などにより測定できる。ルシフェリン、ルシフェラーゼ系を利用したりすることもできる。

カタラーゼを用いた場合、過酸化水素と反応して酸素を生成するので、その酸素を電極などで検知することもできる。電極としてはガラス電極、難溶性塩膜を用いるイオン電極、液膜型電極、高分子膜電極などであることもできる。

酵素標識は、ビオチン標識体と酵素標識アビジン（ストレプトアビジン）に置き換えることも可能である。標識は、複数の異なった種類の標識を使用すること

もできる。こうした場合、複数の測定を連続的に、あるいは非連続的に、そして同時にあるいは別々に行うことを可能にすることもできる。

本発明においては、信号の形成に4-ヒドロキシフェニル酢酸、1, 2-フェニレンジアミン、テトラメチルベンジジンなどと西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ、ウンベリフェリルガラクトシド、ニトロフェニルガラクトシドなどと β -D-ガラクトシダーゼ、グルコース-6-リン酸・デヒドロゲナーゼなどの酵素試薬の組合わせも利用でき、ヒドロキノン、ヒドロキシベンゾキノン、ヒドロキシアントラキノンなどのキノール化合物、リボ酸、グルタチオンなどのチオール化合物、フェノール誘導体、フェロセン誘導体などを酵素などの働きで形成しうるものが使用できる。

蛍光物質あるいは化学ルミネッセンス化合物としては、フルオレセインイソチオシアネート、例えばローダミンBイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネートなどのローダミン誘導体、ダンシルクロリド、ダンシルフルオリド、フルオレスカミン、フィコビリプロテイン、アクリジニウム塩、ルミフェリン、ルシフェラーゼ、エクォリンなどのルミノール、イミダゾール、シュウ酸エステル、希土類キレート化合物、クマリン誘導体などが挙げられる。

標識するには、チオール基とマレイミド基の反応、ビリジルジスルフィド基とチオール基の反応、アミノ基とアルデヒド基の反応などを利用して行うことができ、公知の方法あるいは当該分野の当業者が容易になしうる方法、さらにはそれらを修飾した方法の中から適宜選択して適用できる。また上記免疫原性複合体作製に使用されることのできる縮合剤、担体との結合に使用されることのできる縮合剤などを用いることができる。

縮合剤としては、例えばグルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソチオシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネート、N, N'-ポリメチレンビスオードアセトアミド、N, N'-エチレンビスマレイミド、エチレングリコールビススクシニミジルスクシネート、ビスアゾベンジジン、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、スクシンイミジル-3-(ω -ビリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、N-スクシンイミジル-4-(N'-マレイミドメチル)シクロヘキサニ-1-カルボキシレート(SMCC)、N-ス

ルホスクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノールカルボキシレート、N-スクシンイミジル (4-ヨードアセチル)アミノペンツエート、N-スクシンイミジル 1-(1-マレイミドフェニル)ブチレート、N-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)コハク酸イミド(EMCS)、イミノチオラン、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物、メチル-3-(4'-ジチオビリジル)プロピオンイミデート、メチル-4-メルカプトブチリルイミデート、メチル-3-メルカプトプロピオンイミデート、N-スクシンイミジル-S-アセチルメルカプトアセテートなどが挙げられる。

本発明の測定法によれば、測定すべき物質を酵素などで標識したモノクローナル抗体などの標識抗体試薬と、担体に結合された抗体とを順次反応させることができるし、同時に反応させることもできる。試薬を加える順序は選ばれた担体系の型により異なる。感作されたプラスチックなどのビーズを用いた場合には、酵素などで標識したモノクローナル抗体などの標識抗体試薬を測定すべき物質を含む検体試料と共に最初適当な試験管中に一緒に入れ、その後該感作されたプラスチックなどのビーズを加えることにより測定を行うことができる。

本発明の定量法においては、免疫学的測定法が用いられるが、その際の固相担体としては、抗体などタンパク質を良く吸着するポリスチレン製、ポリカーボネイト製、ポリプロピレン製あるいはポリビニル製のボール、マイクロプレート、スティック、微粒子あるいは試験管などの種々の材料および形態を任意に選択し、使用することができる。

測定にあたっては至適pH、例えばpH約4～9に保つように適当な緩衝液系で行うことができる。特に適切な緩衝剤としては、例えばアセテート緩衝剤、クエン酸塩緩衝剤、フォスフェート緩衝剤、トリス緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ボレート緩衝剤、グリシン緩衝剤、炭酸塩緩衝剤、トリス-塩酸緩衝剤などが挙げられる。緩衝剤は互いに任意の割合で混合して用いることができる。抗体抗原反応は約0℃～60℃の間の温度で行うことが好ましい。

酵素などで標識されたモノクローナル抗体などの抗体試薬及び担体に結合せしめられた抗体試薬、さらには測定すべき物質のインキュベーション処理は、平衡

に達するまで行うことができるが、抗体抗原反応の平衡が達成されるよりもずっと早い時点で固相と液相とを分離して限定されたインキュベーション処理の後、に反応を止めることができ、液相又は固相のいずれかにおける酵素などの標識の存在の程度を測ることができる。測定操作は、自動化された測定装置を用いて行うことが可能であり、ルミネセンス・ディテクター、ホト・ディテクターなどを使用して基質が酵素の作用で変換されて生ずる表示シグナルを検知して測定することもできる。

抗体抗原反応においては、それぞれ用いられる試薬、測定すべき物質、さらには酵素などの標識を安定化したり、抗体抗原反応自体を安定化するように適切な手段を講ずることができる。さらに、非特異的な反応を除去し、阻害的に働く影響を減らしたり、あるいは測定反応を活性化したりするため、タンパク質、安定化剤、界面活性剤、キレート化剤などをインキュベーション溶液中に加えることもできる。キレート化剤としては、エチレンジアミン四酢酸塩(EDTA)がより好ましい。

当該分野で普通に採用されていたりあるいは当業者に知られた非特異的結合反応を防ぐためのブロッキング処理を施してもよく、例えば、哺乳動物などの正常血清タンパク質、アルブミン、スキムミルク、乳発酵物質、コラーゲン、ゼラチンなどで処理することができる。非特異的結合反応を防ぐ目的である限り、それらの方法は特に限定されず用いることができる。

本発明で得られるモノクローナル抗体は、それを用いて標識抗体法に用いることができる。こうした方法は、例えば村松繁、他編、実験生物学講座14、免疫生物学、丸善株式会社、昭和60年、日本生化学会編、続生化学実験講座5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986年などに記載の方法に準じて行うことができる。本発明で得られるモノクローナル抗体は、特に免疫組織化学分野で好ましく利用できる。免疫染色は、標識抗体を直接、組織、細胞中の抗原と反応させてもよいし、あるいははじめに無標識の本発明のモノクローナル抗体を反応させ、(一次抗体)、次いで一次抗体に対して特異性を有する標識抗体(二次抗体)を反応させるといった間接法などによることもできる。間接法としては、例

例えばペルオキシダーゼー抗ペルオキシダーゼ法（PAP法）、アビジンービオチンコンプレックス法（ABC）、プロテインA法などが挙げられる。染色に用いられる組織、細胞などの標法は、例えば、OCT compound（Miles 社）内に組織を埋め込み、液体窒素あるいはドライアイス・アセトン溶液などを用い凍結させて調製することが可能である。またパラフィン包埋、エポキシ樹脂包埋などをして試料標本を調製することができる。

本発明の測定方法で測定される試料としては、あらゆる形態の溶液やコロイド溶液、非流体試料などが使用しうるが、好ましくは生物由来の試料、例えば血液、血清、血漿、関節液、脳脊髄液、唾液、羊水、尿、その他の体液、細胞培養液、組織培養液、組織ホモジネート、生検試料、乳癌組織などの組織、細胞などが挙げられる。

こうして典型的には本発明の目的は、MMP-13に対するモノクローナル抗体及び固相担体用としてMMP-13に対するモノクローナル抗体あるいはTIMPsを用い、被検試料中の遊離の活性型又は潜在型MMP-13を分別定量する優れた方法及びその為の試薬キットを提供することにある。本発明で得られるモノクローナル抗体もしくは該モノクローナル抗体の断片または該標識化物は、特にMMP-13の測定用試薬、癌検査薬、MMP-13の免疫染色用試薬としても有用である。好ましくは癌検査薬、例えば乳癌などを特異的に検出することができる癌検査薬として有用である。またヒト腫瘍またはヒト癌を免疫染色するにも有用である。本発明はこうした遊離の活性型又は潜在型MMP-13を分別定量することのできる試薬キットのうちの各試薬をすべてその実施態様のうちに含むと理解される。さらに本発明の目的は、上記定量法を用いて遊離の活性型又は潜在型MMP-13を分別定量することにより、組織破壊や癌転移などの病態をモニターし得る方法並びに試薬あるいは診断剤を提供することにある。したがって、医学的生理学的分野における上記試薬の各種利用、組織破壊や癌転移、組織の修復の程度の判断、あるいは細胞増殖促進などの生理的作用の指標として上記試薬を使用することはすべて本発明のその実施態様のうちに含まれると理解される。

本発明の前述した種々の態様を利用することにより、癌細胞の有無、癌の悪性度の診断等の癌の診断治療に関わる研究に有用な診断手段として、あるいはその

他の医学的生理学的用途に適用される種々の技術手段を提供することができる。

以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されず、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。なお、明細書及び図面において、用語は、IUPAC IUB Commission on Biochemical Nomenclature によるか、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものである。

後述の実施例 1 e) ~ g) に記載のマウス由来単クローン性抗ヒトコラゲナーゼ 3 抗体産生ハイブリドーマ 181-3C4 は、平成 8 年 12 月 13 日 (寄託日) から茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305) の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託されており (受託番号 FERM P-16001)、平成 9 年 12 月 22 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求がなされ、受託番号 FERM BP-6211 として NIBH に保管されている。同様にマウス由来単クローン性抗ヒトコラゲナーゼ 3 抗体産生ハイブリドーマ 181-7F4 も、平成 8 年 12 月 13 日 (寄託日) から NIBH に寄託されており (受託番号 FERM P-16002)、平成 9 年 12 月 22 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求がなされ、受託番号 FERM BP-6212 として NIBH に保管されている。また、マウス由来単クローン性 抗ウシコラゲナーゼインヒビター 抗体産生ハイブリドーマ 7 23G 9 は、受託番号 FERM BP-3469 として平成 3 年 4 月 17 日 (寄託日) から NIBH に寄託されている (平成 3 年 7 月 1 日の請求により、原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託に移管)。

実施例

以下に実施例を挙げ、本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されること無く様々な態様が含まれることは理解されるべきである。

実施例 1 抗 MMP-13 モノクローナル抗体の作製

組み換えヒトプロ MMP-13 (Knauper et al., J. Biol. Chem., 271, 1544-1550, 1996) を免疫原としてモノクローナル抗体産生クローンを得た。

a) 抗体産生細胞の調製

Knauper et al., J. Biol. Chem., 271, 1544-1550, 1996 に記載の方法により

調製したヒトMMP-13 (41 μ g) を完全フロイントアジュバントと共に6週令BALB/c雌マウス2匹にそれぞれ腹腔内投与し、初回免疫した。19日後および36日目に0.9%塩化ナトリウム水溶液に溶解したヒトMMP-13 (51 μ g) を初回免疫したそれぞれのマウスに腹腔内投与し追加免疫した。更に、71日後に追加免疫時と同様にヒトMMP-13 (51 μ g) を静脈内投与し、最終免疫とした。その3日後に脾臓を摘出し、脾細胞懸濁液とした。

b) 細胞融合

(1) 以下の材料および方法を用いた。

RPMI-1640 培地:

RPMI-1640 (Flow Lab.) に重炭酸ナトリウム (21 mM)、ピルビン酸ナトリウム (1 mM)、ペニシリンGカリウム (50 U/ml)、硫酸アミカシン (100 μ g/ml) を加え、ドライアイスでpHを7.2にし、0.2 μ m東洋メンブレンフィルターで除菌ろ過した。

NS-1 培地:

上記RPMI-1640 培地に除菌ろ過したFCS (M. A. Bioproducts) を15% (v/v) の濃度になるように加えた。

PEG4000 溶液:

RPMI-1640 培地にポリエチレングリコール4000 (PEG4000, Merk & Co.) を50% (w/w) になるように加え、無血清溶液を調製した。

8-アザグアニン耐性ミエローマ細胞SP2 (SP-2/0-Ag14) との融合は、B. B. Mishell and S. M. Shiigi eds., *Selected Method in Cellular Immunology*, W. H. Freeman and Company, 351-372, 1980 に記載の Oi and Herzenberg et al. の方法を若干改変して行った。

(2) 前記a) で調製した有核脾細胞 (生細胞率100%) とミエローマ細胞 (生細胞率100%) とを5:1の割合で融合した。脾臓細胞とミエローマ細胞とを別に前記のRPMI-1640 培地で洗浄し、次に同じ培地で懸濁し、融合させるため上記の割合で混合した。容量50mlのポリプロピレン製遠沈管 (住友ベークライト) を使い、25mlのRPMI 1640 培地中400 \times g, 10分間遠心し、上清

を完全に吸出した。沈殿細胞に37℃加温PEG4000 溶液4.3 mlを1分間で滴下し、さらに1分間攪拌し細胞を再懸濁、分散させた。次に37℃加温RPMI-1640 培地4.3 mlを1分間で滴下した。この操作をさらに1回繰り返した後、同培地2.9.2 mlを2～3分間で常に攪拌しながら滴下し細胞を分散させた。これを400×g、7分間遠心分離し、上清を完全に吸引除去した。

次にこの沈殿細胞に37℃加温、NS-1培地42.7 mlを速やかに加え、細胞の大きい塊を10 mlのピペットを用いて注意深くピペッティングして分散した。更に同培地85.3 mlを加えて希釈し、ポリスチレン製96穴マイクロウェル (Corning) にウェル当り6.0×10⁵個/0.1 mlの細胞を加えた。細胞を加えた上記のマイクロウェルを7%炭酸ガス/93%空気中で温度37℃、湿度100%下に培養に付した。

c) 選択培地によるハイブリドーマの選択的増殖

(1) 使用する培地は以下の通りである。

HAT培地: 前記b) で述べたNS-1培地に、更にヒポキサンチン (100 μM)、アミノプテリン (0.4 μM) およびチミジン (16 μM) を加えた。
HT培地: アミノプテリンを除去した以外は上記HAT培地と同一組成のものである。

(2) 前記b) の培養開始後翌日 (1日目)、細胞にパスツールピペットでHAT培地2滴 (約0.1 ml) を加えた。2、3、5、8日目に培地の半分 (0.1 ml) を新しいHAT培地で置き換えた。11日目にハイブリドーマ生育全ウェルについて次項d) 記載のELISAにより陽性ウェルをチェックした。次にフィーダーとして107個のマウス胸腺細胞を含むHT培地1 mlをポリスチレン製24穴セルウェル (住友ベークライト) に加えたものを用い、上記で検出された各陽性ハイブリドーマの全内容物を移した。これを前記b) と同様に7%炭酸ガス存在下、37℃で約3日間培養に付した。ハイブリドーマの充分生育した時点でELISA法により陽性を再確認し、それぞれについて次項e) 記載の限界希釈法によるクローニングを行った。なお、クローニングに使用後の残液をポリスチレン製25 cm²組織培養フラスコ (岩城硝子) に移し、凍結保存用試料を調製し

た。

d) ELISA 法による抗MMP-13抗体産生ハイブリドーマの検索

Anal. Biochem., 104, 205, 1980に記載のRennard et al.の方法を若干改変した方法を用いた。この方法は、ハイブリドーマ抗体の検出に適している。96穴マイクロタイトレーションプレート (Flow Lab.) を100 ngのヒトMMP-13でコートした。これに前記c) で得られたハイブリドーマ生育ウェルの上清の一部を加えて室温で約1時間インキュベートした。2次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン (Cappel Lab.) を加え、更に室温で約1時間インキュベートした。次に基質である過酸化水素と α -フェニレンジアミンを加え生成した褐色の程度をマイクロプレートリーダー (MRP-A1、東ソー) を用いて492 nmの吸光度を測定し判定した。

e) クローニング

前記c) の操作後、各ウェル中には、2種以上のハイブリドーマが生育している可能性があるため、限界希釈法によりクローニングを行い、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得する。NS-1培地1 ml当りフィーダーとして107個のマウス胸腺細胞を含むクローニング培地を調製し、96穴マイクロウェルの36ウェル、36ウェル及び21ウェル当り5個、1個及び0.5個のハイブリドーマを加えた。5日目に全ウェルに各0.1 mlのNS-1培地を追加した。クローニング開始後11~13日で十分なハイブリドーマの生育が認められ、コロニー形成陰性ウェルが50%以上である群についてELISA法を行った。テストした全ウェルが陽性でない場合、抗体陽性ウェル中のコロニー数を確認し、ウェル中に1コロニーが確認されたウェルを4~6個選び再クローニングする。最終的に表1に示したようにヒトMMP-13に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得た。

f) モノクローナル抗体の生体外増殖及び生体内増殖

モノクローナル抗体の増殖は常法による。すなわち、得られた各ハイブリド-

マをNS-1培地などの適当な培養液で培養（生体外増殖）し、その培養上清から10～100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のモノクローナル抗体を得ることができた。一方、大量に抗体を得るために、脾細胞とミエローマ細胞の由来動物と同系のマウス（BALB/c）に1匹当たり0.5 mlの腫瘍形成促進剤ブリストン（Aldrich Chem. Co.）を腹腔内投与した。1～3週間後に、各ハイブリドーマ1×10⁷個を同じく腹腔内投与し、更にその1～2週間後に生体内で産生された1～4 mg/mlのモノクローナル抗体を含む腹水を得ることができた。

g) モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖

前述した ELISA法に従って、ヒトMMP-13をコートしたマイクロタイトレーションプレートに前記c) で得られた各モノクローンの培養上清を加えた。次にPBSにより洗浄した後、アイソタイプ特異的ウサギ抗マウスIg抗体（Zymed Lab.）を加えた。PBSによる洗浄後、HRP 標識ヤギ抗ウサギIgG（H+L）抗体を加え、基質として過酸化水素及び2, 2'-アジノージ（3-エチルベンゾチアゾリン硫酸）を用いてそれぞれの重鎖及び軽鎖を判定した。その結果をまとめて表1に示した。11種類のクローンを得、それらの内、9種類がIgG1/ κ 、2種類がIgM/ κ であった。

表1

クローン番号	サブクラス	クローン番号	サブクラス
181-187	IgG1/ κ	181-881	IgG1/ κ
181-2D10	IgM/ κ	181-1088	IgG1/ κ
181-3C4	IgG1/ κ	181-11A3	IgM/ κ
181-4E11	IgG1/ κ	181-14G11	IgG1/ κ
181-5A9	IgG1/ κ	181-15A12	IgG1/ κ
181-7F4	IgG1/ κ		

h) モノクローナル抗体の精製

前記 f) で得られた各腹水を 40% 飽和硫酸アンモニウムで分画した後、IgG I クラスの抗体について 0.5 M 塩化ナトリウム含有 1.5 M グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 8.9) で平衡化したアフィゲル プロテイン A (Bio-Rad Lab.) カラム (φ 2.5 × 8.5 cm) に吸着させ、上記緩衝液で洗浄後、0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.0) で溶出した。溶出液 4 ml/フラクションに分画したところ、例えばクローン No. 181-3C4 ではフラクション 28 ~ 35 に、クローン No. 181-7F4 ではフラクション 26 ~ 37 に、クローン No. 181-15A12 ではフラクション 26 ~ 15 に溶出され精製できた。

実施例 2 酵素標識抗体 (IgG-HRP 複合体) の調製

J. Immunoassay, 4, 209-327, 1983 に記載の Ishikawa, et al. の方法に従って、マウス抗ヒト MMP-13 IgG-HRP 複合体を調製した。

a) SH 基標識 IgG の調製

ヒト MMP-13 に対し、反応性が認められたモノクローナル抗体を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) に対し透折し、その溶液に含有される IgG に対して 100 倍モルの S-アセチルメルカプト無水コハク酸をジメチルホルムアミド溶液として加え、30℃、30 分間インキュベーションした。

次に、0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を総容量の 1/5 量、0.1 M EDTA 溶液 (pH 6.0) を総容量の 1/30 量、1 M ヒドロキシルアミン溶液 (pH 7.0) を総容量の 1/5 量加え、30℃、5 分間静置後、5 mM EDTA 含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したセファデックス G-25 でゲルろ過し、SH 基標識マウス抗ヒト MMP-13 IgG を得た。

b) マレイミド標識 HRP の調製

HRP を 10 mg/ml の濃度になるように 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、その HRP 量に対して 2.5 倍モル量の EMC S をジメチルホルムアミド溶液として加え、30℃、30 分間反応させた。この反応液を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したセファデックス G-25 カラムでゲルろ過し

、マレイミド標識HRP 画分を分取した。

c) IgG-HRP 複合体の調製

上記a)で調製したSH基標識IgG 1モルに、上記b)で得られたマレイミド標識HRP を5モルの割合で加え、マレイミド標識HRP の濃度として100 nmol/mlになるように0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)で調整し、4℃、20時間静置した。この混合液を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したウルトロゲルAcA44カラム(Villeneuve-la-Garenne, フランス)でゲルろ過し、マウス抗ヒトMMP-13 IgG-HRP複合体画分を分取した。BSA及びクロルヘキシジンを各々0.1%及び0.002%になるように添加し、4℃で保存した。

実施例3 イムノブロッティング

各クローンのIgG-HRP を調製した。一方、組み換えヒト潜在型MMP-13または4-アミノフェニル酢酸第二水銀(4-APMA)で活性化した組み換えヒトMMP-13を、SDS-PAGEに供し、ニトロセルロース膜に転写後、IgG-HRPを用い染色した。

a) MMP-13の活性化

0.2M 塩化ナトリウム及び10mM 塩化カルシウム含有50mM トリス塩酸緩衝液、pH7.5に溶解したMMP-13に1mMとなるように4-アミノフェニル酢酸第二水銀(4-APMA)を加え、37℃で2時間インキュベーションし、MMP-13を活性化した。

b) 免疫染色

MMP-13または前項a)で活性化したMMP-13をドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に供した後、細胞工学、1882、1061-1068、1983に記載の田部の方法に従ってウエスタンブロッティングを行い、各モノクローンのIgG HRP を用い、免疫染色を行った。MMP-13には潜在型MMP-13と活性型MMP-13があることが知られており、分子量はそれぞれ60kDaと48kDaであるとされている。各モノクローンがいずれのMM

P-13と反応するか判定した。その結果を表2に示した。潜在型MMP-13のみと反応する抗体が1種類(181-3C4)、活性型MMP-13のみと反応する抗体が2種類(181-1B7、181-10B8)存在した。活性型MMP-13のみと反応した抗体は活性型MMP-13のN末近辺または立体構造を認識していると考えられる。その他の抗体は潜在型、活性型両方と反応した。

表2

クローン番号	潜在型	活性型
181-1B7	-	+
181-3C4	+	-
181-4E11	+	+
181-5A9	+	+
181-7F4	+	+
181-10B8	-	+
181-14G11	+	+
181-15A12	+	+

実施例4 MMP-13の定量

各抗体を固相化した96穴マイクロウェル中で粗み換えヒトMMP-13を反応させた。洗浄後、各抗体のIgG-HRPと反応させ、続いて未反応のIgG-HRPを洗浄除去した後、o-フェニレンジアミンを基質としてHRP活性の測定を行った。

抗原と反応するサンドイッチEIA測定系は複数存在した。

a) モノクローナル抗体結合固相担体の調製

J. Immunoassay, 4, 209-327, 1983に記載のIshikawa et al.の方法に従ってマウス抗ヒトMMP-13 IgGを各々0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.5)に溶解し、100 μ g/mlの濃度に調整した。そのモノクローナル抗体溶液を96穴マイ

クロプレートにウェル当り100 μ lずつ加え、4℃、24時間静置した。次にモノクローナル抗体溶液を除去し、各々生理食塩液で3回洗浄後、1%BSA、0.1M塩化ナトリウム及び10mM EDTA含有30mMリン酸緩衝液(pH7.0、緩衝液A)に浸漬し、4℃で保存した。

b) 1ステップサンドイッチEIA測定系の検索

ヒトMMP-13を免疫反応用緩衝液で希釈し96穴ビニルプレート(Falcon)に20 μ l加えた。各モノクローナル抗体より調製した酵素標識抗体を1 μ g/mlとなるように緩衝液Aで希釈し、上記ビニルプレートに各々100 μ lずつ加え混和した。この混合液を前項a)で各モノクローナル抗体より調製した抗体結合プレートに100 μ l加え、室温で1時間反応させ、生理食塩液で3回洗浄した。次に0.02%過酸化水素含有0.1Mクエン酸-リン酸緩衝液(pH4.9)に溶解した2mg/ml オーフェニレンジアミンをウェル当り100 μ l加え、室温で30分間反応後、2N硫酸100 μ l添加し、反応を停止させた。この反応混液のA492をマイクロプレートリーダー(MPR-A4, 東ソー)を用いて測定した。各モノクローナル抗体の組合せによる測定結果を表3に示した。表中の数字はその時の492nm吸光度を示している。

表 3

	固相			
標識抗体	181-1B7	181-3C4	181-4E11	181-5A9
181-1B7	0.010	0.035	1.280	1.528
181-3C4	0.007	-0.002	0.066	0.059
181-4E11	0.263	0.293	0.006	0.006
181-5A9	0.647	0.417	0.006	-0.001
181-7F4	0.038	0.025	0.016	0.023
181-10B8	0.000	0.017	0.422	0.477
181-14G11	0.563	0.573	0.010	0.606
181-15A12	0.405	0.287	-0.002	0.262

表 3 (続 き)

標識抗体	固相			
	181-7F4	181-10B8	181-14G11	181-15A12
181-1B7	1.212	0.046	2.029	1.114
181-3C4	0.067	0.002	0.074	0.023
181-4E11	-0.003	0.051	0.006	0.002
181-5A9	0.079	0.094	0.268	0.972
181-7F4	0.005	0.012	0.003	0.160
181-10B8	0.453	0.002	0.676	0.178
181-14G11	0.021	0.083	0.012	0.032
181-15A12	1.582	0.026	0.002	-0.004

c) 1ステップサンドイッチEIA法

ヒトMMP-13を免疫反应用緩衝液で希釈した標準MMP-13あるいはヒトMMP-13を含む検体を96穴ビニルプレート(Falcon)に各々20 μ l加えた。酵素標識抗体を1 μ g/mlとなるように緩衝液Aで希釈し、上記ビニルプレートに各々100 μ lずつ加え混和した。この混合液を前項a)で調製した抗体結合プレートに100 μ l加え、室温で1時間反応させ、生理食塩液で3回洗浄した。次に0.02%過酸化水素含有0.1Mクエン酸-リン酸緩衝液(pH4.9)に溶解した2mg/ml o-フェニレンジアミンをウェル当り100 μ l加え、室温で30分間反応後、2N硫酸100 μ l添加し、反応を停止させた。この反応混液のA492をマイクロプレートリーダー(MPR-M, 東ソー)を用いて測定し、検量線より検体中のMMP-13量を求めた。

標準抗原0ng/mlの吸光度を5回測定したときの平均(M)と標準偏差(SD)を算出し、M+2SDに相当する標準抗原濃度を感度とすると、その感

度は、測定系A（固相用クローン No. 181-3C4、酵素標識用クローン No. 181-15A12）で 50 pg/ml （ 0.83 pg/assay ）、測定系B（固相用クローン No. 181-7F4、酵素標識用クローン No. 181-15A12）で 80 pg/ml （ 1.3 pg/assay ）であった。なお、両測定系の定量範囲はいずれも $0.13 \sim 16 \text{ ng/ml}$ （ $2.1 \sim 267 \text{ pg/assay}$ ）であった。図1は測定系A（固相用クローン No. 181-3C4、酵素標識用クローン No. 181-15A12）での標準曲線の一例を示すもので、図2は測定系B（固相用クローン No. 181-7F4、酵素標識用クローン No. 181-15A12）での標準曲線の一例を示す。

d) 検体及び緩衝液

免疫反応用緩衝液（1% BSA、0.1 M 塩化ナトリウム及び10 mM EDTA 含有30 mM リン酸緩衝液、pH 7.0）を使用し、前記c）項記載の測定系A及び測定系Bの方法に従って体液中のMMP-13を測定した。検体として関節液を用いる場合で、原液そのものでは粘度が大きく正確な測定値を得ることが困難な場合には上記緩衝液Aで希釈することが好ましい。

e) 同時再現性試験

前記c）に記載した方法に従い、標準抗原について測定系A及び測定系Bの同時再現性試験を行った。両者の標準抗原液の各測定値のいずれのCV値も10%以下であった。その結果を表4に示す。測定系Aは、固相用クローン No. 181-3C4と酵素標識用クローン No. 181-15A12との組合せの測定系で、測定系Bは固相用クローン No. 181-7F4と酵素標識用クローン No. 181-15A12との組合せの測定系である。

表 4 同時再現性

		proMMP-13 (ng/ml)					
		0.25	0.5	1	2	4	8
測定系A	A492	0.032	0.065	0.127	0.245	0.511	1.070
	CV (%)	5.9	3.6	4.7	5.6	2.4	9.7
測定系B	A492	0.054	0.118	0.233	0.469	0.908	1.802
	CV (%)	6.7	1.4	0.8	2.2	2.4	6.0

f) 添加回収試験

健常人血清 20 μ l に標準抗原液 (0、1、2、4、8、16 ng/ml)、各 20 μ l を添加したものを検体とし、80 μ l の酵素標識抗体液 (1250 ng/ml) を加えた。以下の操作は、前記 c) に記載した操作法と同様に行い、ヒトMMP-13量を測定し、回収された標準抗原量を算出した。血清中の標準抗原量の平均回収率は測定系Aで101%、測定系Bで93%であり、いずれも十分な回収率が得られた。その結果を表5に示す。測定系Aは、固相用クローン No. 181-3C4と酵素標識用クローン No. 181-15A12との組合せの測定系で、測定系Bは固相用クローン No. 181-7F4と酵素標識用クローン No. 181-15A12との組合せの測定系である。

表 5 添加回収試験

添加量 (ng/ml)	測定系A		測定系B	
	血清1	血清2	血清1	血清2
1	105%	102%	91%	86%
2	99%	100%	86%	89%
4	105%	100%	93%	100%
8	94%	105%	95%	96%
16	98%	101%	96%	102%
平均	101%		93%	

実施例 5

各種疾患における関節液や血清中のMMP-13の測定を測定系A及びBで行った。測定は慢性関節リウマチ (RA) 患者関節液 (n=5)、健康者血清 (n=6)、RA患者血清 (n=9)、変形性関節症 (OA) 患者血清 (n=5)、乳癌患者血清 (n=10)、大腸癌患者血清 (n=5)及び胃癌患者血清 (n=5)を用いて行い、いずれの測定系においてもMMP-13が測定可能であった。なお、測定系Aは、固相用クローン No. 181-3C4と酵素標識用クローン No. 181-15A12との組合せの測定系で、その結果を図3に示し、測定系Bは、固相用クローン No. 181-7F4と酵素標識用クローン No. 181-15A12との組合せの測定系で、その結果を図4に示してある。

その結果、RA患者の関節液で高値検体が存在し、RAの血清及び乳癌の血清で健康者のそれと比べ高値検体が存在した。

実施例 6

MMP-13及び前記のように4-APMAで活性化したMMP-13を、予め0.2 M塩化ナトリウム及び10 mM 塩化カルシウム含有50 mM トリス塩酸緩衝液、pH 7

5で平衡化したUltroGel AcA54 (φ1.5×72cm)を用いてそれぞれゲル濾過を行った。各フラクションを緩衝液Aで希釈し、前記のように測定系A (固相用クローン No. 181-3C4, 酵素標識用クローン No. 181-15A12)、測定系B (固相用クローン No. 181-7F4, 酵素標識用クローン No. 181-15A12) 及び測定系C (固相用クローン No. 181-1B7, 酵素標識用クローン No. 181-15A12) で測定した。

測定系Aにおいては潜在型MMP-13のみのピークが認められ、活性化したMMP-13をゲル濾過したフラクションにおいてはそのピークは消失した。測定系Bを用いたときは3つのピークが認められ、潜在型及びそれに混在する自己消化により生じたと考えられる活性型と反応した。活性化することにより潜在型が消失し、活性型のみとなった。測定系Cにおいては潜在型と反応せず活性型とのみ反応した。図5には、潜在型MMP-13についての測定結果 (サンドイッチEIA 法による検出MMP-13) を示し、図6には活性型MMP-13についての測定結果 (サンドイッチEIA 法による検出MMP-13) を示す。

実施例7 MMPsに対する特異性試験

間質型コラゲナーゼ (MMP-1) : ヒト皮膚線維芽細胞 CCD-11SK (ATCC No. CRL 1505) より、Clin. Chim. Acta, 219, 1-14, 1993 に記載の Zhang et al. の方法に従い精製した。

72 kDaゼラチナーゼ (MMP-2) : ヒト新生児皮膚線維芽細胞 NB1RGB (RCB 222) より Clin. Chim. Acta, 221, 91-103, 1993 に記載の Fujimoto et al. の方法に従い精製した。

ストロムライシン-1 (MMP-3) : 上記 NB1RGB より Clin. Chim. Acta, 211, 59-72, 1992 に記載の Obata et al. の方法に従い精製した。

好中球コラゲナーゼ (MMP-8) : ヒト胎盤より Clin. Chim. Acta, 244, 129-143, 1996 に記載の Matsuki et al. の方法に従い精製した。

92 kDaゼラチナーゼ (MMP-9) : ヒト線維肉腫細胞 HIT1080 (ATCC No. CCL 121) より J. Biol. Chem., 267, 21712-21719, 1992 に記載の Okada et al. の方法に従い精製した。

MT1-MMP: Cancer Res., 56, 2207-2210, 1996 に記載の Imai et al. の方法に従いヒトリコンビナントMT1-MMP を精製した。

免疫染色で陽性となった抗ヒトMMP-13モノクローナル抗体、8つのクローン: 181-1B7、181-3C1、181-4E11、181-5A9、181-7F4、181-10B8、181-14G11 及び181-15A12 を用い、ELISA を行った。96穴マイクロタイトレーションプレート (Costar) を50 ngの上記のヒトMMP-1、ヒトMMP-2、ヒトMMP-3、ヒトMMP-8、ヒトMMP-9、ヒトMT1-MMP またはヒトMMP-13で4℃、一晩コートした。これに各抗ヒトMMP-13モノクローナル抗体より調製したIgG-HRP (1 µg/ml) を加えて室温で1時間インキュベートした。次に基質である過酸化水素とオ-フェニレンジアミンを加え生成した褐色の程度をマイクロプレートリーダー (MRP-A1、東ソー) を用いて492 nmの吸光度を測定し判定した。いずれのモノクローナル抗体もヒトMMP-1、ヒトMMP-2、ヒトMMP-8、ヒトMMP-9、ヒトMT1-MMP と交差反応せず、ヒトMMP-13に対して特異的に反応することが示された。また、6つのクローン: 181-3C1、181-4E11、181-5A9、181-7F4、181-14G11 及び181-15A12 は、ヒトMMP-13に対して特異的に反応することが示された。

実施例8 組織染色

ヒト組織に対して本発明のマウス由来単クローン性抗ヒトコラゲナーゼ3抗体を用いて免疫組織染色を行った。ヒト組織のホルマリン固定パラフィン切片 (5 µm) について、ストレプトアビジン-ビオチン法により染色した。先ずモノクローナル抗体181-15A12 を20 mMリン酸緩衝液 (pH7.2) で希釈し、組織切片と室温で30分間反応した。次に、ビオチン化抗体 (Biogenex, San Ramon, CA) と室温で20分間反応し、続いてストレプトアビジン-アルカリフォスファターゼと室温で20分間反応した。最後にナフトールリン酸を含むファーストレッドを用いて染色した。ヘマトキシリンで対比染色後、脱水しAquatex (Merck, Darmstadt, Germany) に包埋した。

その結果、乳癌組織 (図7) や喉頭癌組織において、上皮細胞や間質細胞が染色された。特異性を調べるために対照として、無感作マウスのIgGで同様に染

色を試みたが、染色されなかった。さらに、コラゲナーゼ3との前処理により結合部位をブロックしたモノクローナル抗体181-15A12²によっては染色されなかったもので、本染色反応はコラゲナーゼ3抗体特異的であると考えられた。

実施例9

4-APMAで活性化したMMP-13と、ティッシュ・インヒビター・オブ・メタロプロテアーゼ-1 (TIMP-1)を1対0～1対10の比率で混合し37℃で1時間反応させMMP-13-TIMP-1複合体を調製した。これらのサンプルについて、測定系D (固相用クローン No. 7-23C9 (マウス抗TIMP-1抗体、Kodama et al., Collagen Rel. Res., 7, 341-350, 1987), 酵素標識用クローン No. 181-15A12)で測定した。その結果を、図8に示す。

TIMP-1が存在しないとき (MMP-13とTIMP-1の比率が1対0のとき)、吸光度はでなかった。また、TIMP-1のMMP-13に対する比率が大きくなるにつれて、吸光度は上昇し、1:1付近でプラトーに達し、それ以上の比率ではほぼ一定となり、測定系Dにより定量的にMMP-13-TIMP-1複合体のみが測定された。

産業上の利用可能性

本発明では、精製MMP-13を用いて作製された、抗MMP-13モノクローナル抗体を用いて、潜在型及び活性型MMP-13を免疫学的に定量することができる。それぞれのMMP-13置を分別して定量し得る。簡単な操作及び試薬を用い、感度並びに精度良く、また迅速に、被検試料中の潜在型MMP-13の測定あるいは活性型MMP-13の測定や潜在型、活性型MMP-13両方をそれぞれ定量しうる。MMP-13の免疫学的測定を達成できることにより、慢性関節リウマチなどのような炎症性疾患、癌、腫瘍性疾患においても重要な働きをしていると考えられる活性型MMP-13を精度良く且つ迅速に分別定量できるので、これら炎症反応の診断の道を開き、さらには慢性関節リウマチなどのような炎症性疾患、腫瘍性疾患、転移性癌などの診断剤として有用である。

請 求 の 範 囲

1. MMP-13活性を有するタンパク質又はその塩及びMMP-13活性を有するタンパク質の部分ペプチド又はその塩からなる群から選ばれたものに特異的に反応するものであることを特徴とするモノクローナル抗体。

2. (1) 活性型MMP-13及び潜在型MMP-13の双方に特異的に反応するもの、(2) 潜在型MMP-13のみに特異的に反応するもの、あるいは(3) 活性型MMP-13のみに特異的に反応するものであることを特徴とする請求項1記載のモノクローナル抗体。

3. MMP-13活性を有するタンパク質又はその塩及びMMP-13活性を有するタンパク質の部分ペプチド又はその塩からなる群から選ばれたものに特異的に反応するモノクローナル抗体を試薬として用い、潜在型MMP-13、活性型MMP-13及びティッシュ・インヒビター・オブ・メタロプロテアーゼ結合MMP-13の少なくともいずれか一つをその他のものと区別して検出・測定することを特徴とするMMP-13の検出・測定方法。

4. MMP-13に対し特異的に反応するモノクローナル抗体のうちMMP-13の実質的に異なる領域に対し特異的に反応するモノクローナル抗体であって且つそれらモノクローナル抗体のうちの少なくとも二種類を測定試薬として用いて免疫学的に測定を行うことを特徴とするMMP-13の免疫学的定量法。

5. MMP-13に対し特異的に反応するモノクローナル抗体のうち一方が、(1) MMP-13の活性型並びに潜在型の双方に対し特異的に反応するモノクローナル抗体であるか、(2) MMP-13の潜在型のみに特異的に反応するモノクローナル抗体であるか、あるいは(3) MMP-13の活性型のみに特異的に反応するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項4記載の定量法。

6. 使用する二種類の抗体が、各々MMP-13の活性型並びに潜在型の双方に対し特異的に反応するモノクローナル抗体であり、潜在型及び活性型MMP-13を測定することを特徴とする請求項4記載の定量法。

7. 使用する二種類の抗体の一方が、MMP-13の活性型並びに潜在型の双方

に対し特異的に反応するモノクローナル抗体で、他方はMMP-13の潜在型に特異的に反応するモノクローナル抗体であり、潜在型MMP-13を測定することを特徴とする請求項4記載の定量法。

8. 使用する二種類の抗体の一方が、MMP-13の活性型並びに潜在型の双方に対し特異的に反応する抗体で、他方はMMP-13の活性型に特異的に反応するモノクローナル抗体であり、活性型MMP-13を測定することを特徴とする請求項4記載の定量法。

9. (1) 潜在型MMP-13を活性型MMP-13に転化するものである活性化剤存在下に測定を行うか、あるいは(2) 潜在型MMP-13が活性型MMP-13に転化することを阻害する阻害剤存在下に測定を行うことを特徴とする請求項4記載の定量法。

10. MMP-13活性を有するタンパク質、それと実質的に同等な活性を有するタンパク質又はその塩及びその部分ペプチド又はその塩からなる群から選ばれたものを抗原として用い、それに対する抗体を得ることを特徴とする請求項1～4のいずれか一記載の抗体の製造方法。

11. MMP-13活性を有する組換えタンパク質又はその塩及びMMP-13活性を有する組換えタンパク質の部分ペプチド又はその塩からなる群から選ばれたもので免疫した動物から得られ且つMMP-13活性を有するタンパク質又はその塩及びMMP-13活性を有するタンパク質の部分ペプチド又はその塩からなる群から選ばれたものに特異的に反応する抗体を産生することを特徴とする継代培養可能なハイブリドーマ細胞。

12. MMP-13活性を有する組換えタンパク質又はその塩及びMMP-13活性を有する組換えタンパク質の部分ペプチド又はその塩からなる群から選ばれたもので免疫した動物から得られた抗体を産生する細胞を、継代培養可能な細胞と融合せしめ、継代培養可能でかつMMP-13を包含するタンパク質に対する抗体を産生するハイブリッド細胞を選別することを特徴とする継代培養可能なハイブリドーマ細胞作製方法。

13. 請求項1または2記載のモノクローナル抗体もしくは該モノクローナル抗体の断片または該標識化物を含有することを特徴とするMMP-13の測定用試

薬。

14. 請求項1または2記載のモノクローナル抗体もしくは該モノクローナル抗体の断片または該標識化物を含有することを特徴とする癌検査薬。

15. 請求項1または2記載のモノクローナル抗体もしくは該モノクローナル抗体の断片または該標識化物を含有することを特徴とするMMP-13の免疫染色用試薬。

図 1

標準曲線 (測定系A)

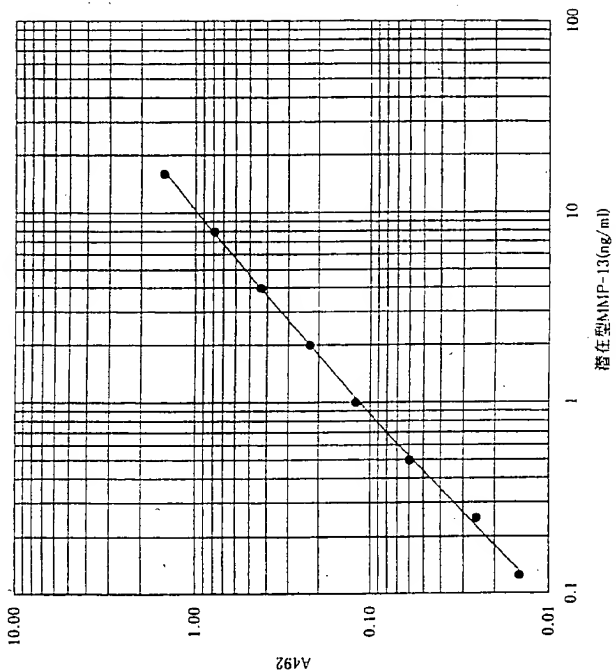


図 2

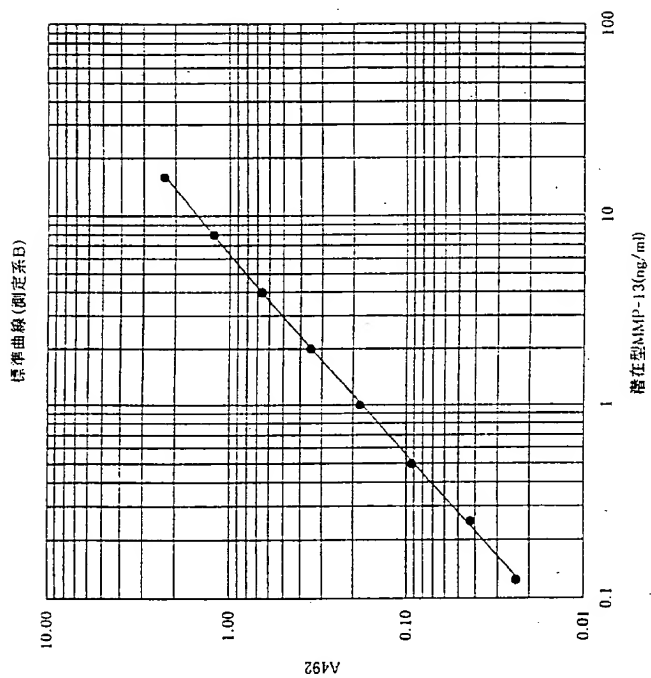
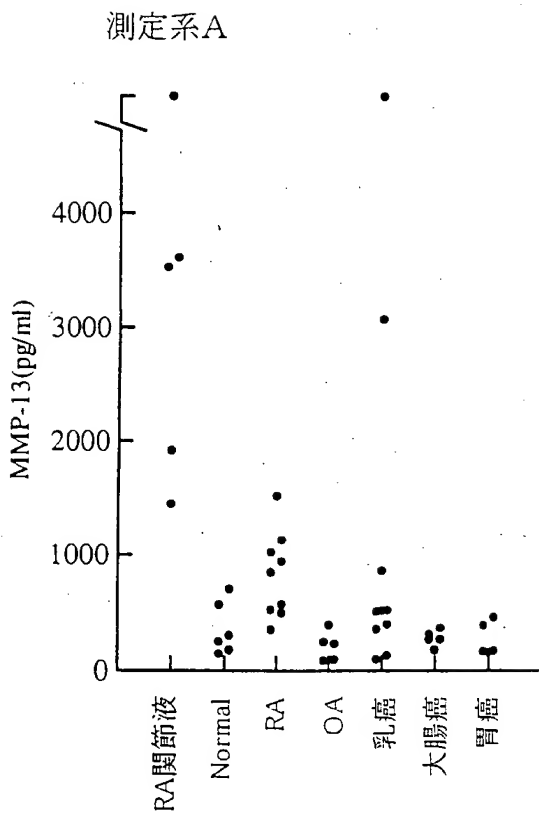


図 3



4 / 8

図 4

測定系B

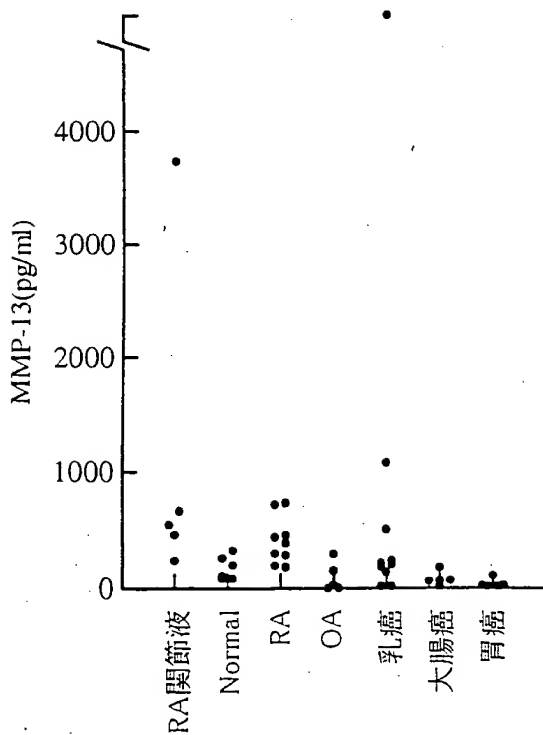


図 5

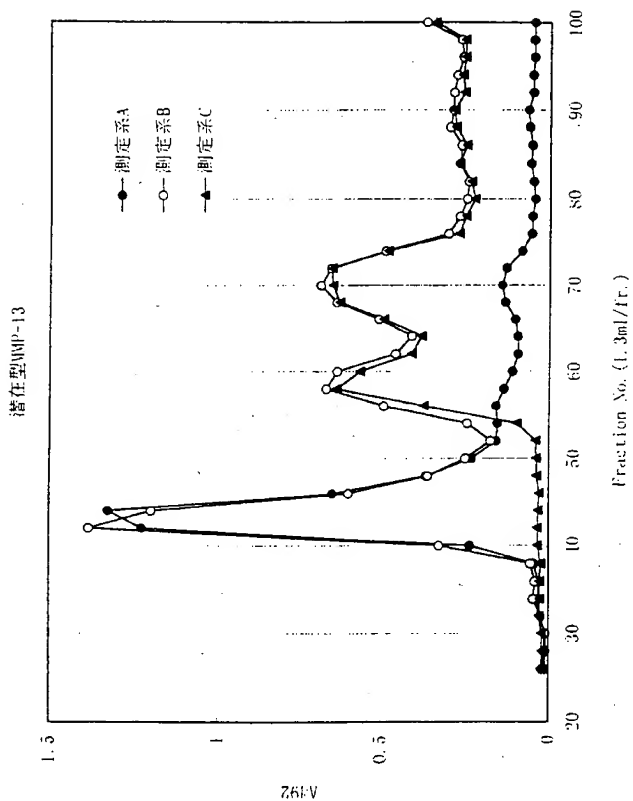
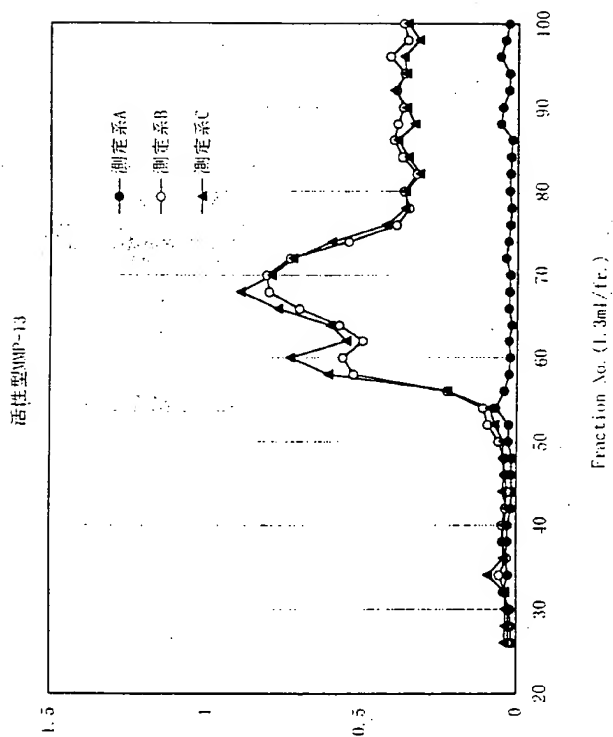


図 6



A-192

7 / 8

☒ 7

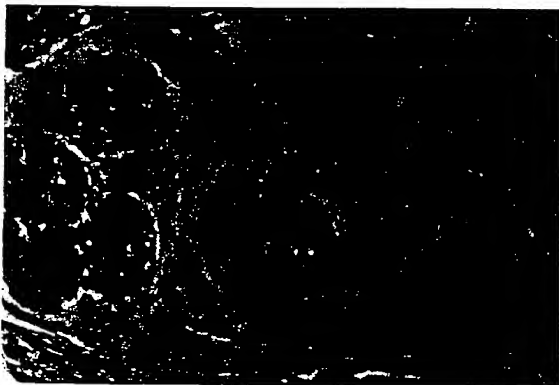
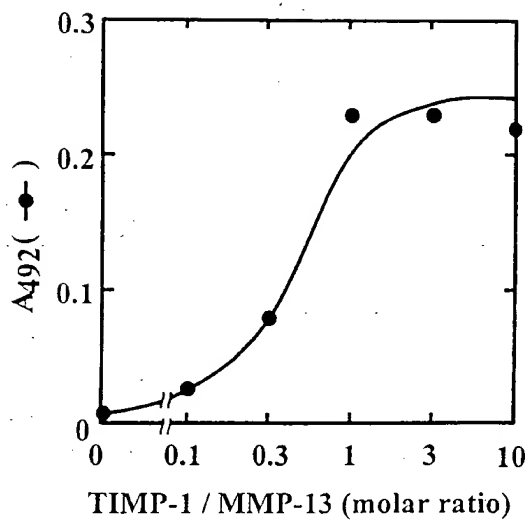


図 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/04884

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12P21/08, C07K16/40, G01N33/577

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12P21/08, C07K16/40, G01N33/577

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Biosis Previews, Medline

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. Clin. Invest., Vol. 97, (May 1996), Reboul P. et al. "The New Collagenase-3, Is Expressed and Synthesized by Human Chondrocytes but not by Synoviocytes" p. 2011-2019	1-2, 4-6, 9-15 3, 7, 8
Y	J. Biol. Chem., Vol. 271, (Jan. 1996), Knäuper V. et al. "Biochemical Characterization of Human Collagenase-3" p. 1544-1550	1-2, 4-6, 9-15 3, 7, 8
X	J. Biol. Chem., Vol. 269, (1994), Freije J.M.P. et al. "Molecular Cloning and Expression of Collagenase-3, a Novel Human Matrix Metalloproteinase Produced by Breast Carcinomas" p. 16766-16773	1-2, 4-6, 9-15 3, 7, 8
Y		

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

February 26, 1998 (26. 02. 98)

Date of mailing of the international search report

March 10, 1998 (10. 03. 98)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/04884

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Biochemistry, Vol. 27, (1988), Birkedal-Hansen B. et al. "Monoclonal antibodies to human fibroblast procollagenase. Inhibition of enzymatic activity, affinity purification of the enzyme, and evidence for clustering of epitopes in the NH ₂ -terminal end of the activated enzyme." p. 6751-6758	3, 7, 8
A	JP, 8-201392, A (Fuji Chemical Industries, Ltd.), August 9, 1996 (09. 08. 96) (Family: none)	1 - 15
A	JP, 6-300757, A (Fuji Chemical Industries, Ltd.), October 28, 1994 (28. 10. 94) (Family: none)	1 - 15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ C12P21/08, C07K16/40, G01N33/577		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ C12P21/08, C07K16/40, G01N33/577		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
Biosis Previews, Medline		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	J. Clin. Invest., 第97巻, (May 1996), Reboul P. et al. "The New Collagenase-3, Is Expressed and Synthesized by Human Chondrocytes but not by Synoviocytes" p. 2011-2019	1-2, 4-6, 9-15 3, 7, 8
X Y	J. Biol. Chem., 第271巻, (Jan. 1996), Knäuper V. et al. "Biochemical Characterization of Human Collagenase-3" p. 1544-1550	1-2, 4-6, 9-15 3, 7, 8
X Y	J. Biol. Chem., 第269巻, (1994), Freije J. M. P. et al. "Molecular Cloning and Expression of Collagenase-3, a Novel Human Matrix Metalloproteinase Produced by Breast Carcinomas" p. 16766-16773	1-2, 4-6, 9-15 3, 7, 8
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリ 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に及ぼす文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 26.02.98		国際調査報告の発送日 10.03.98
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 平田 和男 印
		4 B 7823
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Biochemistry, 第27巻, (1988), Birkedal-Hansen B. et al Monoclonal antibodies to human fibroblast procollagenase. Inhibition of enzymatic activity, affinity purification of the enzyme, and evidence for clustering of epitopes in the NH ₂ -terminal end of the activated enzyme. Jp. 6751-6758	3, 7, 8
A	JP, 8-201392, A (富士薬品工業株式会社) 9. 8頁. 1996 (09. 08. 96) (ファ ミリーなし)	1-15
A	JP, 6-300757, A (富士薬品工業株式会社) 28. 10頁. 1994 (28. 10. 94) (フ アミリーなし)	1-15